

## Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Ribonukleinsäuren durch chemische und enzymatische Modifikation:

1. Teil:  $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$  aus Kaninchenleber — Sequenzanalyse,  
Codonerkennung und Nachweis eines ungewöhnlichen  
 $\text{U}_{54} : \text{A}_{60}$  Basenpaares.
2. Teil: Identifizierung von einsträngigen und bihelikalen  
Strukturbereichen in Viroid-RNA (CPFV).

Peter Jank

---

1977

---







Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Ribonukleinsäuren  
durch chemische und enzymatische Modifikation:

1. Teil: tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> aus Kaninchenleber - Sequenzanalyse,  
Codonerkennung und Nachweis eines ungewöhnlichen  
U<sub>54</sub> : A<sub>60</sub> Basenpaares.

2. Teil: Identifizierung von einsträngigen und bihelikalen  
Strukturbereichen in Viroid - RNA (CPFV).

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
des  
Fachbereichs Chemie und Pharmazie  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt

von

Peter Jank

aus

Kaufbeuren

1977



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Zillig  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann  
Tag der mündlichen Prüfung: 22.7.1977

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG  
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München in der Abteilung "Organische Chemie und Spektroskopie" (Direktor: Prof. Dr. Heinz Dannenberg, verstorben am 13. 2. 1975) unter der Anleitung von Herrn Dr. habil. H.J. Gross in der Zeit von Mai 1974 bis Dezember 1976 durchgeführt.

Herrn Dr. H.J. Gross danke ich besonders herzlich für seine stete Hilfe, die vielen guten Anregungen und die zahlreichen kritischen Diskussionen.

Darüber hinaus habe ich zu danken:

Herrn Prof. S. Nishimura, Tokyo, für die Ausführung der Ribosomenbindungstests;

Herrn Prof. D. Riesner, Hannover, für die Durchführung der physikalisch-chemischen Messungen;

Herrn Prof. H.L. Sängers, Gießen, für die Reinigung und Bereitstellung des Viroids (CPFV), sowie für die Untersuchung der Infektiosität des modifizierten Viroids;

Herrn Dr. G. Klotz und Herrn Prof. A.K. Kleinschmidt, Ulm, für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen des modifizierten Viroids;

Herrn Prof. U.L. RajBhandary, M.I.T., für das Geschenk von tRNA aus  $E. coli$ ;

Herrn Dr. M. Saneyoshi, Tokyo, für die Mitteilung einer unveröffentlichten Vorschrift zur zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie von Nukleotiden.

Herrn H. Domdey danke ich für die Überlassung seiner Sequenzierungsdaten von CPFV, sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die anregenden Diskussionen und die kameradschaftliche Unterstützung.



## Inhaltsverzeichnis:

|                                                                                                                                                                   | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. Einleitung                                                                                                                                                     | 1     |
| B. Problemstellung                                                                                                                                                | 5     |
| B. 1. Problemstellung für Teil 1: tRNA                                                                                                                            | 5     |
| B. 2. Problemstellung für Teil 2: Viroide                                                                                                                         | 7     |
| C. Ergebnisse und Diskussion Teil 1: tRNA                                                                                                                         | 8     |
| C. 1. Darstellung und Reinigung der " <sup>m</sup> 7G-Fragmente" von tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup> aus Kaninchenleber                                          | 8     |
| C. 2. Sequenzierung der " <sup>m</sup> 7G-Fragmente" von tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup> aus Kaninchenleber                                                      | 10    |
| C. 2.1. Nukleotidanalyse, "Fingerprints" und kontrollierter Abbau der Oligonukleotide mit Schlangengiftphosphodiesterase                                          | 10    |
| C. 2.2. Erläuterungen zu den aus den Abspaltungsmustern ermittelten Oligonukleotidsequenzen                                                                       | 17    |
| C. 3. Codonerkennung von tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup> aus Kaninchenleber                                                                                      | 21    |
| C. 4. Physikalisch-chemische Eigenschaften des 3'-Fragmentes von tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup> aus Kaninchenleber - Zahl und Art der Basenpaare im "TΨC"-Stamm | 24    |
| C. 5. Methylierung von tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup> aus Kaninchenleber mit einer tRNA-Methylase-Fraktion aus E.coli                                           | 28    |
| C. 5.1. Vorversuche zum Nachweis der Methylierbarkeit von tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup> mit E.coli-Methylase                                                   | 28    |
| C. 5.2. Nukleotidanalyse der methylierten tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup>                                                                                        | 30    |
| C. 5.3. Spaltung der methylierten tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup> mit Ribonuklease T <sub>1</sub> zur Eingrenzung des Methylierungsortes                         | 32    |

|         |                                                                                                                                                                     |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| C. 5.4. | Sequenzanalyse des methylierten<br>Ribonuklease $T_1$ -Fragmentes von $tRNA_{1}^{Val}$                                                                              | 35 |
| C. 5.5. | Vergleichende spezifische $U_{54}$ -Methylierung von $tRNA_{1}^{Val}$ aus Kaninchenleber und $tRNA$ aus $T^-$ E.coli mit einer $tRNA$ -Methyltransferase aus E.coli | 37 |
| C. 6.   | Versuche zur homologen enzymatischen Methylierung von $U_{54}$ in Leber- $tRNA_{1}^{Val}$ mit einem Rattenleberenzym <u>in vitro</u>                                | 40 |
| C. 6.1. | Analytische und präparative Methylierung von $tRNA_{1}^{Val}$ mit homologem Rattenleberenzym                                                                        | 40 |
| C. 6.2. | Nukleotidanalyse der homolog methylierten $tRNA_{1}^{Val}$                                                                                                          | 42 |
| C. 7.   | Versuche zur heterologen enzymatischen Methylierung von $U_{54}$ in $tRNA$ aus $T^-$ E.coli mit einem Rattenleberenzym <u>in vitro</u>                              | 44 |
| C. 7.1. | Analytische und präparative heterologe Methylierung von $tRNA$ aus $T^-$ E.coli mit Rattenleberenzym                                                                | 44 |
| C. 7.2. | Nukleotidanalyse der heterolog methylierten $tRNA$ aus $T^-$ E.coli                                                                                                 | 45 |
| C. 8.   | Versuche zur enzymatischen Methylierung von $T_{54}$ in E.coli- $tRNA$ zu 2'-O-Methyl-Ribothymidin ( $Tm_{54}$ ) mit Rattenleberenzym <u>in vitro</u>               | 49 |
| C. 8.1. | Präparative Methylierung von E.coli- $tRNA$ mit Rattenleberenzym                                                                                                    | 49 |
| C. 8.2. | Nukleotidanalyse der methylierten $tRNA$ aus E.coli                                                                                                                 | 50 |
| D.      | Ergebnisse und Diskussion Teil 2:<br>Viroid-Struktur (CPFV)                                                                                                         | 53 |
| D. 1.   | Methylierungsversuche von CPFV mit verschiedenen Methyltransferasen                                                                                                 | 53 |

|         |                                                                                                                                                    |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| D. 2.   | Reaktionsmechanismus und Anwendung der Bisulfitmodifikation von Nukleinsäuren                                                                      | 53 |
| D. 3.   | Reaktionsbedingungen für die Modifikation von Viroid-RNA und Grundzüge der Fingerprintanalyse des modifizierten Viroids                            | 55 |
| D. 4.   | Analyse der Ribonuklease A - Fingerprints von bisulfitmodifiziertem CPFV und Klassifizierung der Oligonukleotide auf Grund ihrer Modifizierbarkeit | 57 |
| D. 5.   | Analyse der Ribonuklease $T_1$ -Fingerprints von bisulfitmodifiziertem CPFV                                                                        | 63 |
| D. 5.1. | Identifizierung und Sequenzierung modifizierter Oligonukleotide                                                                                    | 63 |
| D. 5.2. | Sequenzierung einiger unvollständig modifizierter Oligonukleotide                                                                                  | 66 |
| D. 5.3. | Klassifizierung der Reaktivität der Ribonuklease $T_1$ -Fragmente gegenüber Bisulfit mit ihrer Problematik                                         | 68 |
| D. 6.   | Verknüpfung von Ribonuklease $T_1$ - und Ribonuklease A-Fragmenten auf Grund ihrer Reaktivität gegenüber Bisulfit                                  | 71 |
| D. 7.   | Rekonstruktion der stabilen doppelhelicalen Bereiche von CPFV                                                                                      | 74 |
| D. 8.   | Schlußfolgerungen aus den beobachteten Reaktivitäten gegenüber Bisulfit für die CPFV-Sekundärstruktur                                              | 76 |
| D. 9.   | Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CPFV vor und nach Bisulfitbehandlung                                                                        | 77 |
| D. 10.  | Diskussion von Viroid-Modellen                                                                                                                     | 80 |
| D. 11.  | Infektiosität von CPFV nach Bisulfitbehandlung                                                                                                     | 83 |
| D. 12.  | Ableitung allgemeiner Beziehungen zwischen Bruttozusammensetzung von Oligonuk-                                                                     |    |

|                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| leotiden und ihrer Lage auf dem<br>Fingerprint                                                                                       | 84  |
| D. 12.1. Allgemeine Vorbemerkungen                                                                                                   | 84  |
| D. 12.2. Schema für den Ribonuklease A-Fingerprint                                                                                   | 85  |
| D. 12.3. Schema für den Ribonuklease T <sub>1</sub> -Fingerprint                                                                     | 87  |
| E. Experimenteller Teil                                                                                                              | 90  |
| E. 1. Material und Geräte                                                                                                            | 90  |
| E. 1.1. Materialien                                                                                                                  | 90  |
| E. 1.2. Geräte                                                                                                                       | 93  |
| E. 2. Methoden                                                                                                                       | 94  |
| E. 2.0. Reinigung von tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup> aus Kaninchenleber                                                            | 94  |
| E. 2.1. " <sup>7</sup> G-Spaltung" von tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup> aus<br>Kaninchenleber                                        | 95  |
| E. 2.2. Analytische und präparative Diskelektro-<br>phorese                                                                          | 95  |
| E. 2.3. Herstellung von Methyltransferase-Roh-<br>extrakten aus E.coli bzw. aus Rattenleber                                          | 96  |
| E. 2.4. Analytische Methylierung von tRNA                                                                                            | 97  |
| E. 2.5. Präparative Methylierung und Isolierung<br>der methylierten tRNA                                                             | 101 |
| E. 2.6. Enzymatische Methoden zur Bestimmung von<br>Art und Lage der methylierten Nukleoside<br>in tRNA                              | 102 |
| E. 2.6.1 Ribonuklease T <sub>2</sub> -Spaltung zur Nukleotid-<br>analyse                                                             | 102 |
| E. 2.6.2 Behandlung mit alkalischer Phosphatase                                                                                      | 102 |
| E. 2.6.3 Ribonuklease T <sub>1</sub> -Spaltung oder Ribonuklea-<br>se A-Spaltung zur Eingrenzung der Lage<br>methylierter Nukleoside | 102 |
| E. 2.6.4 Spaltung mit Schlangengiftphosphodiester-<br>ase zur Sequenzierung von RNA-Fragmenten<br>bzw. zur Nukleotidanalyse          | 103 |
| E. 2.7 Chromatographische Trennmethode                                                                                               | 104 |
| E. 2.7.1 Säulenchromatographie                                                                                                       | 104 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| E. 2.7.2 Dünnschichtchromatographie                                                                                                                                                                                                                                                    | 106   |
| E. 2.7.3 Homochromatographie                                                                                                                                                                                                                                                           | 107   |
| E. 2.8. Darstellung von $\gamma$ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP                                                                                                                                                                                                                              | 108   |
| E. 2.9. Spaltung von RNA mit Ribonuklease $T_1$<br>bzw. Ribonuklease A, Abspaltung der 5'-<br>Phosphatgruppen mit alkalischer Phospha-<br>tase und 5'- $[^{32}\text{P}]$ -Phosphorylierung der<br>Oligonukleotide mit 5'-Polynukleotidki-<br>nase aus T4 - Phagen - infizierten E.coli | 109   |
| E. 2.10. Zweidimensionale Auftrennung von radio-<br>aktiv markierten RNA-Fragmenten: "Finger-<br>print"                                                                                                                                                                                | 112   |
| E. 2.11. Vollständiger bzw. partieller Abbau von<br>5'- $[^{32}\text{P}]$ -markierten Oligonukleotiden<br>mit Schlangengiftphosphodiesterase oder<br>Nuklease $P_1$                                                                                                                    | 113   |
| E. 2.12. Auftrennung der partiellen Abbauproduk-<br>te und Sequenzermittlung                                                                                                                                                                                                           | 115   |
| E. 2.13. Modifikation von RNA mit Bisulfit                                                                                                                                                                                                                                             | 118   |
| F. Zusammenfassung                                                                                                                                                                                                                                                                     | 119   |
| F. 1. Zusammenfassung Teil 1: tRNA                                                                                                                                                                                                                                                     | 119   |
| F. 2. Zusammenfassung Teil 2: Viroid-<br>Struktur (CPFV)                                                                                                                                                                                                                               | 120   |
| G. Literaturverzeichnis                                                                                                                                                                                                                                                                | 121   |
| H. Lebenslauf                                                                                                                                                                                                                                                                          | 128   |



# Abkürzungsverzeichnis:

|                                                                                  |                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A, Ado                                                                           | Adenosin                                                                                                                    |
| $m^1A$                                                                           | 1-Methyladenosin                                                                                                            |
| $m^6A$                                                                           | 6-Methyladenosin                                                                                                            |
| $A_{260}$                                                                        | Absorbtion bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke                                                                                 |
| 1 $A_{260}$ -Einheit RNA                                                         | RNA-Menge, die in 1 ml $H_2O$ gelöst bei 260 nm und 1 cm Lichtweg eine Absorbtion von 1 ergibt<br>( $\approx 50 \mu g$ RNA) |
| Ac                                                                               | Acetat                                                                                                                      |
| Ado-Met                                                                          | S-Adenosyl-Methionin                                                                                                        |
| ATP                                                                              | Adenosintriphosphat                                                                                                         |
|  | blauer Farbstoff "Xylene Cyanol FF"                                                                                         |
| C                                                                                | Cytidin                                                                                                                     |
| $m^5C$                                                                           | 5-Methylcytidin                                                                                                             |
| Ci                                                                               | Curie                                                                                                                       |
| CPFV                                                                             | "Gurkenbleichfrucht"-Viroid<br>( <u>c</u> ucumber <u>p</u> ale <u>f</u> ruit <u>v</u> iroid)                                |
| cpm                                                                              | Impulse pro Minute<br>( <u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute)                                                          |
| D                                                                                | 5,6-Dihydrouridin                                                                                                           |
| DC                                                                               | Dünnschichtchromatographie                                                                                                  |
| DEAE                                                                             | Diäthylaminoäthyl-                                                                                                          |
| DNA                                                                              | Desoxyribonukleinsäure                                                                                                      |
| E                                                                                | Einheit(en)                                                                                                                 |
| EDTA                                                                             | Äthylendiamintetraacetat                                                                                                    |
| Fr.no.                                                                           | Fraktionsnummer                                                                                                             |
| g                                                                                | Erdbeschleunigung bzw. Gramm                                                                                                |
| G                                                                                | Guanosin                                                                                                                    |
| $m^2G$                                                                           | 2-Methylguanosin                                                                                                            |
| $m^7G$                                                                           | 7-Methylguanosin                                                                                                            |
| " $m^7G$ -Spaltung"                                                              | Selektive chemische Spaltung von tRNA am $m^7G$ der Extraschleife (62)                                                      |
| h                                                                                | Stunden                                                                                                                     |

|                                  |                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Homo                             | Homochromatographie                                                                                                                                                        |
| HVE                              | Hochspannungselektrophorese<br>( <u>h</u> igh <u>v</u> oltage <u>e</u> lectrophoresis)                                                                                     |
| l                                | Liter                                                                                                                                                                      |
| M                                | molar (Konzentration)                                                                                                                                                      |
| "M"                              | "M"-Wert ( <u>m</u> igration value)                                                                                                                                        |
| MSH                              | Mercaptoäthanol                                                                                                                                                            |
| min                              | Minuten                                                                                                                                                                    |
| N                                | Nukleosid                                                                                                                                                                  |
| p                                | Phosphat z.B.<br>Ap = Adenosin-3'-Phosphat<br>pA = Adenosin-5'-Phosphat                                                                                                    |
| Phosphat in<br>Oligonukleotiden  | Auf die Angabe der Phosphodiester-<br>bindungen, sowie der 5'-Phosphate<br>bei Oligonukleotiden in Fingerprints<br>wurde zumeist verzichtet:<br>z.B. AAAG = 5' pApApApG 3' |
| PPO                              | 2,5 Diphenyloxazol                                                                                                                                                         |
| RNA                              | Ribonukleinsäure                                                                                                                                                           |
| mRNA                             | Boten-( <u>m</u> essenger-) Ribonukleinsäure                                                                                                                               |
| tRNA                             | Transfer-Ribonukleinsäure                                                                                                                                                  |
| tRNA <sup>Val</sup> <sub>1</sub> | Hauptspezies der valinakzeptierenden<br>tRNAs                                                                                                                              |
| RNAase                           | Ribonuklease                                                                                                                                                               |
| RT                               | Raumtemperatur                                                                                                                                                             |
| T                                | Ribothymidin                                                                                                                                                               |
| T <sup>-</sup> E.coli            | E.coli-Mutante deren Ribothymidinsyn-<br>these (aus Uridin) stark herabge-<br>setzt ist                                                                                    |
| Tm                               | 2'-O-Methyl-Ribothymidin                                                                                                                                                   |
| TCA                              | Trichloressigsäure ( <u>t</u> richloroacetic<br><u>a</u> cid)                                                                                                              |
| TEAB                             | Triäthylammoniumbicarbonat                                                                                                                                                 |
| Tris                             | Trishydroxymethylaminomethan                                                                                                                                               |
| U                                | Uridin                                                                                                                                                                     |
| UV                               | ultraviolett                                                                                                                                                               |
| UZ                               | Ultrazentrifugation                                                                                                                                                        |
| Ψ                                | Pseudouridin                                                                                                                                                               |

## A. Einleitung

Nukleinsäuren lassen sich in zwei Klassen einteilen: Die Desoxyribonukleinsäuren (DNAs), die nur als zentrale genetische Informationsträger fungieren (1) und die Ribonukleinsäuren (RNAs), die eine Reihe unterschiedlicher Funktionen erfüllen können.

Die Boten- oder messenger-Ribonukleinsäuren (mRNAs) und die viralen RNAs stehen in enger Beziehung zur DNA, da ihre Sequenzen ebenfalls informativen Charakter besitzen (2).

Die Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) sind als Adaptermoleküle das wichtige Bindeglied zwischen der Nukleinsäuresequenz der mRNAs bzw. der viralen RNAs und der Aminosäuresequenz der Proteine (3,4).

Die ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNAs) bauen zusammen mit verschiedenen Proteinen die Ribosomen auf, an denen die Proteinbiosynthese stattfindet (5).

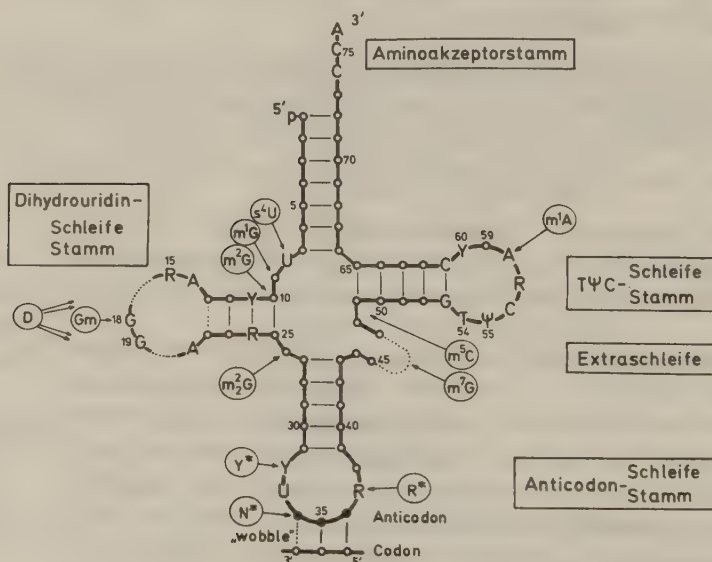
Einen völlig neuen Typ von RNA stellen schließlich die Viroide dar. Sie sind infektiöse und pathogene Ribonukleinsäuren, die Pflanzenkrankheiten hervorrufen. Im Gegensatz zu den Viren besitzen sie jedoch keine Proteinhülle (6) und von allen anderen RNAs unterscheiden sie sich dadurch, daß sie als einsträngige, kovalent geschlossene zirkuläre Moleküle vorliegen (7).

Die folgende Arbeit beschäftigt sich im wesentlichen mit Strukturuntersuchungen an zwei verschiedenen RNA-Typen: tRNA einerseits und Viroide andererseits.

Über die Struktur von tRNA liegen bereits sehr viele Daten vor.

Die Tertiärstruktur von tRNA<sup>Phe</sup> aus Hefe konnte durch die in

den letzten vier Jahren verfeinerte Röntgenstrukturanalyse bis zu einer Auflösung von  $2,5 \text{ \AA}$  ermittelt werden (8,9,10). Seit der Veröffentlichung der ersten tRNA-Sequenzen durch Holley (11) und Zachau (12) sind bis heute fast 100 tRNAs aus den verschiedensten Organismen sequenziert worden (13,14). Die Allgemeingültigkeit des "Kleeblatt"-Modells für die tRNA-Sekundärstruktur wurde wiederholt bestätigt. Durch den systematischen Vergleich aller bekannten tRNA-Sequenzen traten weitere Regelmäßigkeiten (Abb. 1) hervor, die in einem verallgemeinerten Kleeblattmodell dargestellt sind (13-16).



**Abb. 1:** Verallgemeinertes Kleeblattmodell von tRNA mit den invarianten Positionen einiger häufig modifizierter Nukleoside (13-17).  
Y = Pyrimidin, R = Purin, N = Nukleosid,  
\* = Modifikation

So kann man bei tRNA variable und konservative Bereiche unterscheiden. Zu den variablen Teilen zählt der Dihydrouridin-

stamm und die Dihydrouridinschleife sowie die Extraschleife, deren Länge bei den verschiedenen tRNAs stark schwankt. Konservative Bereiche sind die Anticodonschleife (7 Nukleotide), der Anticodonstamm (5 Basenpaare), die T $\Psi$ C-Schleife (7 Nukleotide), der T $\Psi$ C-Stamm (5 Basenpaare) und der Aminoakzeptorstamm (7 Basenpaare + 4 Nukleotide am 3'-Ende). Auch die Lage der modifizierten Nukleoside in tRNA (17) ist erstaunlich invariant. Nur ganz bestimmte Nukleoside in bestimmten Positionen, zumeist in Schleifen, sind modifiziert (Abb. 1).

Im Gegensatz zur tRNA ist über die Struktur der Viroide nur wenig bekannt (6,18). Viroide bestehen aus etwa 350 Nukleotiden, die einen kovalent geschlossenen Ring bilden (7). An der Ermittlung der Primärstruktur einiger Viroide wird in diesem Labor zur Zeit intensiv gearbeitet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und physikalisch-chemische Messungen (7, 19) deuten auf eine interessante Sekundärstruktur hin, die durch das "Hantel"-Modell beschrieben wird (Abb. 2). Der RNA-Ring der Viroide liegt in nativer Form infolge einer hohen Selbstkomplementarität als langgestreckte Hantel mit einem starren helikalen Bereich in der Mitte und einsträngigen Schleifen an den Enden vor.



Abb. 2: Hantelmodell für die Sekundärstruktur von Viroiden (19).

Die Funktion der Viroide, d.h. die molekulare Grundlage ihrer Wirtsspezifität, Infektiosität, Pathogenität und Replikation ist noch völlig unbekannt.

Dagegen sind die Funktionen der tRNA bereits seit langem gut verstanden.

Durch die Wechselwirkung einzelner Nukleotidtripletts der mRNA (Codons) mit den entsprechenden komplementären "Anticodons" der tRNAs wird der genetische Code (20) der Nukleinsäuresequenz entschlüsselt und in die entsprechende Aminosäuresequenz der Proteine umgesetzt (21). Obwohl die Prinzipien der Proteinbiosynthese und die Rolle der tRNA weitgehend aufgeklärt sind, bleiben noch viele Einzelheiten unklar. Eines der ungelösten Probleme bei tRNA ist z.B. die Rolle der modifizierten Nukleoside, deren Lage, wie bereits erwähnt, erstaunlich konservativ ist. Bis zu 20 % der Nukleoside einer tRNA können modifiziert sein. Der Modifikationsgrad nimmt dabei mit der Evolution zu (22,23). Die meisten Modifikationen beruhen auf einer einfachen Methylierung, jedoch sind auch weitaus komplexere Nukleoside gefunden und identifiziert worden (17,24). Die Biosynthese der seltenen Nukleoside findet auf Polynukleotidebene statt und ist wesentlicher Bestandteil der posttranskriptionalen Modifikation der tRNA-Vorläufermoleküle (25,26,27). Die methylierenden Enzyme sind noch wenig charakterisiert. Sie sind nukleosid-, sequenz- und tertiärstrukturspezifisch (26,28-31) und benötigen S-Adenosylmethionin (32-34) bzw. in einigen Fällen ein Tetrahydrofolsäurederivat als Methyl donor (35-42).

Die folgende Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Teil 1 befaßt sich mit tRNA. Neben der enzymatischen Modifikation von Nukleosiden werden Einzelheiten der Sekundärstruktur sowie die Codonerkennung von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber untersucht. Teil 2 enthält Strukturuntersuchungen von Viroiden mittels selektiver chemischer Modifikation.

## B. Problemstellung

### B. 1. Problemstellung für Teil 1: tRNA

Den Anstoß zu den Experimenten gab die Veröffentlichung der Primärstruktur von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> aus Maus-Myelomzellen (43,44). Diese tRNA weist einige Besonderheiten auf, die sie für weitere Untersuchungen interessant machten.

Im Gegensatz zu den meisten anderen tRNAs ist das Uridin Nr. 54 (U<sub>54</sub>) in der "TΨC"-Schleife dieser tRNA nicht zu Ribothymidin (T<sub>54</sub>) methyliert (Abb. 1 und 3). Außerdem ist das dem U<sub>54</sub> gegenüberliegende Nukleosid nicht wie bei allen anderen bekannten tRNAs ein Pyrimidin, sondern Adenosin (A<sub>60</sub>, Abb. 3).

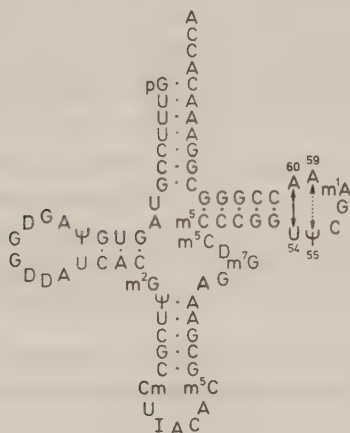


Abb. 3: tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> aus Maus-Myelomzellen (43,44).  
Mögliche zusätzliche Basenpaare sind durch  
Doppelpfeile gekennzeichnet.

Dadurch sind in dieser tRNA zusätzliche Basenpaare, U<sub>54</sub>:A<sub>60</sub>  
bzw. Ψ<sub>55</sub>:A<sub>59</sub> möglich, wodurch der "TΨC"-Stamm verlängert

und die "T $\Psi$ C"-Schleife verkürzt wäre. Das Vorliegen eines U<sub>54</sub>:A<sub>60</sub> Basenpaares könnte der Grund für die fehlende Methylierung von U<sub>54</sub> in vivo sein.

Einige Ergebnisse anderer Gruppen deuten darauf hin, daß eine tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub>-Hauptspezies bevorzugt das Codon GUG erkennt (45,46). Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zur Sequenz IAC des Anticodons von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub>. Die Wobble-Hypothese von Crick (47) erlaubt nur eine Basenpaarung von IAC mit den Codons GUC, GUU und GUA; eine Wechselwirkung mit dem Codon GUG ist jedoch nach Crick nicht möglich.

Die Problemstellung für den ersten Teil dieser Arbeit läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Sequenzierung der in diesem Labor gereinigten tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> aus Kaninchenleber und Vergleich mit der Sequenz von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> aus Maus-Myelomzellen (43,44). Die bisherigen Vergleiche homologer tRNAs aus verwandten Organismen ließen eine weitgehende Übereinstimmung vermuten (48-52).
2. Darstellung und Reinigung eines 3'-Fragmentes von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> aus Kaninchenleber für physikalisch-chemische Messungen am "T $\Psi$ C"-Stamm mit dem Ziel einer Bestimmung von Zahl und Art der Basenpaare in diesem Bereich (mit D. Riesner, Hannover).
3. Darstellung einer spezifischen U<sub>54</sub>-tRNA-Methyltransferase für Methylierungsexperimente mit tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> (siehe Punkt 4).
4. Vergleich der Methylierbarkeit des möglicherweise basengepaarten U<sub>54</sub> in tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> mit der Methylierbarkeit von U<sub>54</sub> in tRNA aus T<sup>-</sup> E.coli, bei der U<sub>54</sub> keine Basenpaarung eingehen kann.

5. Im Zusammenhang mit den modifizierten Nukleosiden  $T_{54}$  bzw.  $Tm_{54}$  ( $Tm_{54}$  wurde in diesem Labor bei lysinspezifischen tRNAs aus Kaninchenleber gefunden) sollten die entsprechenden Methyltransferasen in Rattenleber nachgewiesen und charakterisiert werden (53,54).
6. Untersuchung der Codonerkennung von  $tRNA_1^{Val}$  aus Kaninchenleber (mit S. Nishimura, Tokyo).

## B. 2. Problemstellung für Teil 2: Viroide

Um die Sekundärstruktur der Viroide (19) zu studieren (Abb. 2), sollte die Methode der selektiven chemischen Modifikation von RNA mit Bisulfit auf die Viroid-RNA angewandt werden (55-61). Dieses Reagenz wandelt sehr spezifisch und bevorzugt nicht-basengepaartes Cytidin in Uridin um. Basengepaartes Cytidin in den helikalen Bereichen reagiert dabei nicht oder nur sehr langsam. Nach enzymatischer Fragmentierung der mit Bisulfit modifizierten Viroid-RNA sollten die einzelnen Sequenzbereiche aufgrund ihrer Reaktivität einem der beiden Strukturelemente, Helix oder Einzelstrang, zugeordnet werden.

Die Aufgabenstellung für den zweiten Teil der Arbeit kann folgendermaßen umschrieben werden:

1. Modifizierung eines Viroids (CPFV) mit Bisulfit unter verschiedenen geeigneten Bedingungen (Umwandlung von C in U).
2. Fragmentierung des modifizierten Viroids mit RNAase  $T_1$  und RNAase A, radioaktive Markierung durch in vitro -  $[^{32}P]$ -Phosphorylierung und Auftrennung der Fragmente.
3. Sequenzierung der modifizierten Fragmente (die Sequenzen der Fragmente von unbehandeltem

Viroid wurden von H. Domdey ermittelt). Zuordnung der Fragmente auf Grund ihrer Reaktivität gegenüber Bisulfit zu helikalen bzw. einzelsträngigen Regionen des nativen Viroids.

## C. Ergebnisse und Diskussion Teil 1: tRNA

### C. 1. Darstellung und Reinigung der "m<sup>7</sup>G-Fragmente" von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber

Mit der Darstellung der "m<sup>7</sup>G-Fragmente" von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber wurden zwei Ziele verfolgt:

1. Zunächst sollte durch Sequenzierung der Fragmente deren Reinheit gezeigt und die vermutete Identität der tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber mit der bereits sequenzierten tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Maus-Myelomzellen (43,44) bestätigt werden.
2. Am 3'-Fragment von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> sollte mit physikalisch-chemischen Methoden die Zahl und Art der Basenpaare im "TΨC"-Stamm bestimmt werden (mit D. Riesner, Hannover).

Zur Darstellung der "m<sup>7</sup>G-Fragmente" (62,63) wurden 180 A<sub>260</sub>-Einheiten reiner tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber mit Alkali und saurem Anilinpuffer, wie in den "Methoden" (E. 2.2) beschrieben, umgesetzt und das Gemisch der beiden Fragmente durch Chromatographie über eine DEAE-Zellulose-Säule von überschüssigem Reagenz befreit (Tab. 8). Die Trennung der beiden Fragmente gelang durch eine präparative Diskelektrophorese auf einem 11 %igen Polyacrylamid-Gel (64) unter dissoziierenden Bedingungen (Abb. 4).

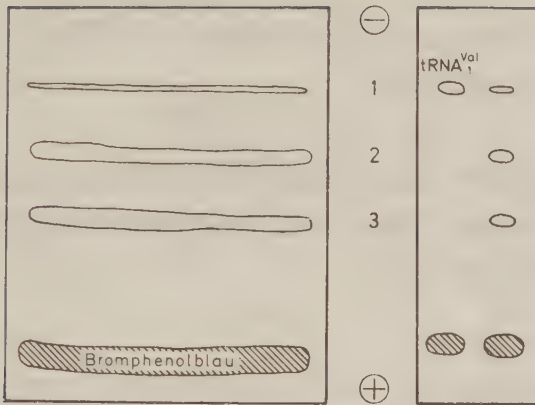


Abb. 4: Präparative (links) und analytische (rechts) Disk-elektrophorese der " $m^7G$ -Spaltprodukte" von  $tRNA_1^{Val}$  nach Anfärbung mit Toluidinblau. 11%iges Polyacrylamidgel (64).

1 = ungespaltene  $tRNA_1^{Val}$

2 = 5'-Fragment von  $tRNA_1^{Val}$

3 = 3'-Fragment von  $tRNA_1^{Val}$

Die angefärbten Fragmente wurden ausgeschnitten und jedes Fragment wurde durch zwei weitere präparative Diskelektrophoresen in einem 11%igen bzw. 16%igen Polyacrylamidgel gereinigt. Um die Substanzverluste möglichst gering zu halten, wurden die ausgeschnittenen Gelstreifen dabei nach Homogenisation direkt auf das nächste Gel aufpolymerisiert. Schließlich wurden die gereinigten Fragmente aus dem letzten Gel extrahiert und über eine DEAE-Zellulose-Säule isoliert. Es standen danach etwa  $10 A_{260}$ -Einheiten hochgereinigter Fragmente frei von gegenseitiger Kontamination zur Verfügung.

C. 2.     Sequenzierung der "<sup>7</sup>m<sup>7</sup>G-Fragmente" von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup>  
          aus Kaninchenleber

C. 2.1.   Nukleotidanalyse, "Fingerprints" und kontrollier-  
          ter Abbau der Oligonukleotide mit Schlangengift-  
          phosphodiesterase

Mit der Sequenzierung der "<sup>7</sup>m<sup>7</sup>G-Fragmente" sollte deren Reinheit und die Identität der untersuchten tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber mit der bereits sequenzierten tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Maus-Myelomzellen (43,44) bestätigt werden.

Die Sequenzierung der beiden Fragmente von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> sollte ausschließlich mittels [<sup>32</sup>P]-Markierung in vitro und der von Sanger entwickelten Technik (65-68) durchgeführt werden. Es sollten nur die nach Spaltung mit RNAase T<sub>1</sub> und RNAase A entstehenden Oligonukleotide sequenziert werden.

Ein Überblick über das Vorkommen modifizierter Nukleotide in dieser tRNA ergab sich bei der Nukleotidanalyse von intakter tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> nach Spaltung mit RNAase T<sub>2</sub> und zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie (Abb. 5).

Die Nukleotidanalyse bestätigte das Vorliegen der auf Grund der Sequenz von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Maus-Myelomzellen (Abb. 3) erwarteten modifizierten Nukleotide. Eindeutig identifizierbar waren m<sup>5</sup>Cp, m<sup>7</sup>Gp, m<sup>2</sup>Gp, Ψp und CmpUp. Das Nukleotid Tp fehlte auf der Dünnschichtplatte (Pfeil, Abb. 5).

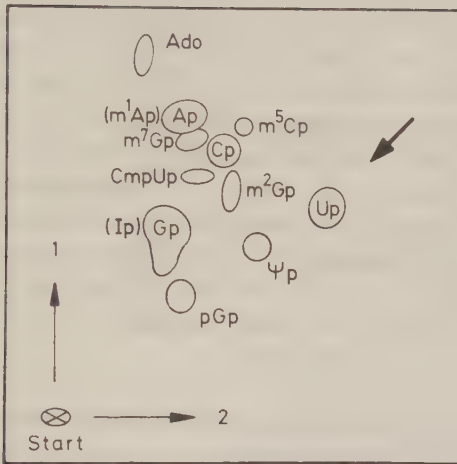


Abb. 5: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie eines RNAase T<sub>2</sub>-Hydrolysates von tRNA<sup>Val</sup> zur Nukleotidanalyse. Die Nukleotide wurden im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und auf Grund ihrer Lage identifiziert.

Der Pfeil kennzeichnet den Ort des in dieser tRNA fehlenden Tp

Laufmittel: 1 = A<sub>1</sub> , 2 = A<sub>2</sub>

Bei dieser Nukleotidanalyse konnte keine Aussage über das Vorkommen der seltenen Nukleotide m<sup>1</sup>Ap, Ip und Dp gemacht werden. m<sup>1</sup>Ap und Ip fallen auf dem Chromatogramm mit Ap bzw. Gp zusammen. Dp bleibt wegen seiner nichtaromatischen Natur im UV-Licht unsichtbar. Diese drei Nukleotide wurden jedoch bei der "5'-Endgruppenanalyse" entsprechender Oligonukleotide eindeutig identifiziert (Abb. 10).

Durch die Nukleotidanalyse war die Grundlage für die anschließende Sequenzierung geschaffen. Jedes der beiden "m<sup>7</sup>G-Fragmente" von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> wurde mit RNAase T<sub>1</sub> bzw.

mit RNAase A gespalten. Die entstandenen Oligonukleotide wurden mit alkalischer Phosphatase behandelt (Abspaltung der 3'-Phosphate) und in vitro mit  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP und Polynukleotid-5'-Kinase phosphoryliert. Das Gemisch der nun am 5'-Ende radioaktiv markierten Oligonukleotide wurde durch zweidimensionale Hochspannungselektrophorese (1. Dimension: Zelluloseacetat, pH 3,5 ; 2. Dimension: DEAE-Papier, 7% Ameisensäure) getrennt und nach Autoradiographie sichtbar gemacht ("Fingerprint"). Die hier erhaltenen Fingerprints (Abb. 6 und 7) waren denen, die von in vivo [ $^{32}\text{P}$ ]-markierter  $\text{tRNA}_{\text{Val}}^1$  aus Maus-Myelomzellen erhalten worden waren ( 44 ), sehr ähnlich.

Die radioaktiven Oligonukleotide wurden aus dem DEAE-Papier eluiert. Ein kleines Aliquot davon wurde mit Schlangengiftphosphodiesterase im Überschuß gespalten. Die freigesetzten radioaktiven Nukleotide der 5'-Enden wurden dünn-schicht-chromatographisch identifiziert ("5'-Endgruppenanalyse").

Der größere Teil der radioaktiven Oligonukleotide wurde einem kontrollierten schrittweisen Abbau mit wenig Schlangengiftphosphodiesterase unterworfen. Die einzelnen Abbauprodukte wurden zu verschiedenen Zeitpunkten abgefangen und durch eindimensionale Hochspannungselektrophorese getrennt ("Abspaltungsmuster"). Die Sequenz der untersuchten Oligonukleotide konnte aus den Abspaltungsmustern mit Hilfe der errechneten "M"-Werte ("migration values", 65) in den meisten Fällen ermittelt werden (Abb. 8 und 9). Eine Hemmung des Abbaus, erkennbar an einer Anhäufung des entsprechenden Oligonukleotids, ließ auf ein modifiziertes Nukleotid schließen. In einigen Fällen war der Vergleich mit den Abspaltungsmustern anderer, in diesem Labor sequenzierter Oligonukleotide sehr hilfreich zur Sequenzermittlung. Die kürzeren Di- und Trinukleotide konnten allein auf Grund ihrer eindeutigen Lage im Fingerprint identifiziert werden. Ein Überblick ist in den Abbildungen 8 und 9 gegeben.



Abb. 6: Fingerprints des 3'-Fragmentes von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> ( "m<sup>7</sup>G-Spaltung" ) mit den zugeordneten Sequenzen:

- nach RNAase T<sub>1</sub>-Spaltung
- nach RNAase A-Spaltung

Die Sequenzen wurden durch partiellen Abbau der Oligonukleotide mit Schlangengiftphosphodiesterase ermittelt (siehe Abb. 9)

◊ = blauer Farbstoff "Xylene Cyanol FF"

1.Dimension: Zelluloseacetat, pH 3,5

2.Dimension: DEAE-Papier, 7 % Ameisensäure

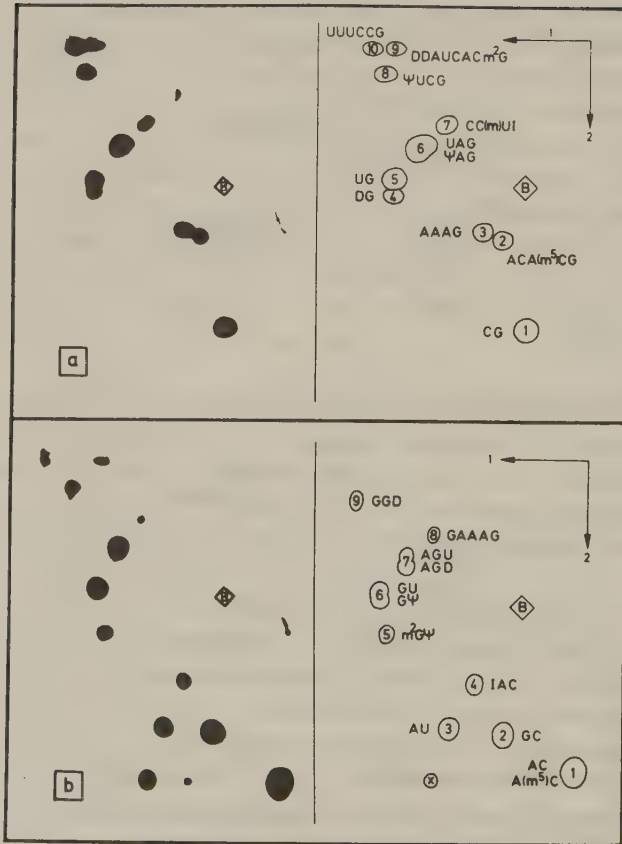


Abb. 7: Fingerprints des 5'-Fragmentes von tRNA<sup>Val</sup> ( "m<sup>7</sup>G-Spaltung" ) mit den zugeordneten Sequenzen:

a. nach RNAase T<sub>1</sub>-Spaltung

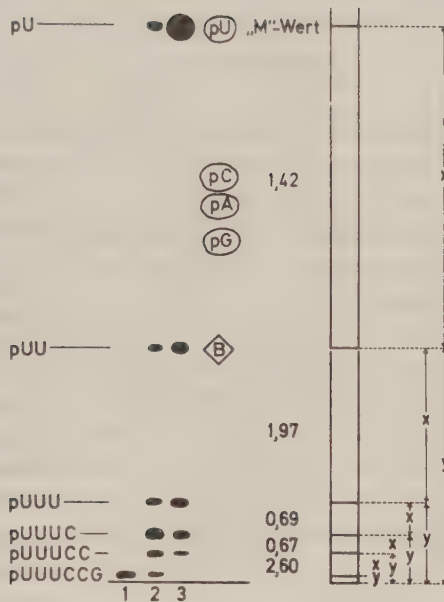
b. nach RNAase A-Spaltung

Die Sequenzen wurden durch partiellen Abbau der Oligonukleotide mit Schlangengiftphosphodiesterase ermittelt (siehe Abb. 9)

◇ = blauer Farbstoff "Xylene Cyanol FF"

1.Dimension: Zelluloseacetat, pH 3,5

2.Dimension: DEAE-Papier, 7 % Ameisensäure



**Abb. 8:** Sequenzierung eines 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten Oligonukleotids durch kontrollierten schrittweisen Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase und Auftrennung der Abbauprodukte durch eindimensionale Hochspannungselektrophorese in 5% Eisessig / Pyridin pH 3,5. Das jeweils abgespaltene Nukleotid wurde aus den berechneten "M"-Werten ermittelt.

**links:** Autoradiographie der aufgetrennten Abbauprodukte mit den zugeordneten Sequenzen  
 1 = intaktes Oligonukleotid vor Enzymzugabe  
 2,3 = nach Zugabe von Schlangengiftphosphodiesterase zu verschiedenen Zeitpunkten entnommene Proben

**mitte:** Referenzsubstanzen: Mononukleotide und (B) = blauer Farbstoff "Xylene Cyanol FF".

**rechts:** Schematisierung des Abspaltungsmusters für die Dokumentation. Die Berechnung der "M"-Werte erfolgte nach der Formel  $M = x/y$  wobei y die Laufstrecke eines Oligonukleotids und x der Abstand zu seinem ersten Abbauprodukt ist (65,67). "M"-Werte siehe Tab. 15.

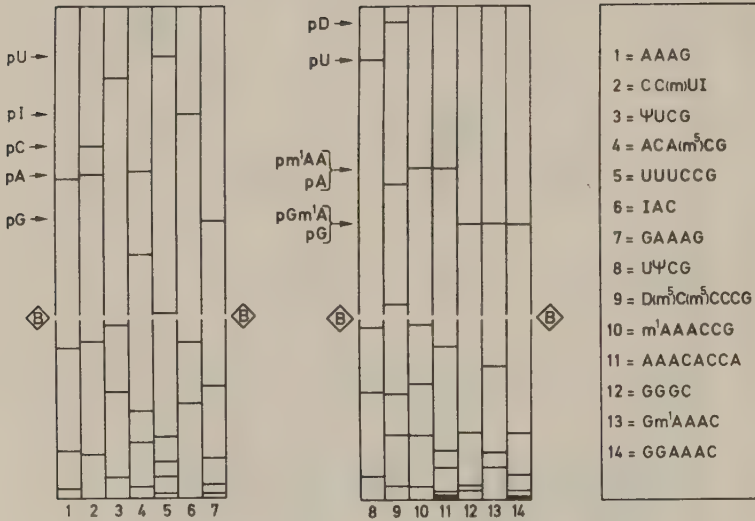


Abb. 9: Schematische Darstellung des sequentiellen Abbaus der längeren 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten Oligonukleotide mit den ermittelten Sequenzen. Trennung durch eindimensionale Hochspannungselektrophorese auf DEAE-Papier in 5% Eisessig/Pyridin pH 3,5

links: Oligonukleotide des 5'-Fragmentes von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> (Abb. 7)

rechts: Oligonukleotide des 3'-Fragmentes von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> (Abb. 6)

Die Sequenz des RNAase T<sub>1</sub>-Fragmentes DDAUCACm<sup>2</sup>G (Abb. 7) konnte mit der angewandten Methode nicht eindeutig bestimmt werden. Der Methylierungsgrad von Cytidin in den Fragmenten 2, 4 und 9 war ebenfalls nicht genau feststellbar.

◇B = blauer Farbstoff "Xylene Cyanol FF"

C. 2.2. Erläuterungen zu den aus den Abspaltungsmustern  
ermittelten Oligonukleotidsequenzen (Abb. 9)

Oligonukleotid 2 = CC(m)UI

Eine zusätzliche Bande dicht neben der des Dinukleotides pCpC (im Abspaltungsmuster nicht eingezeichnet) wies auf eine partielle Modifikation des zweiten Cytidins hin. Das Auffinden des Dinukleotides CmpUp bei der Nukleotidanalyse von  $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$  (Abb. 5) war ein hinreichender Beweis für eine partielle Ribosemethylierung dieses Nukleotids. Das Inosin am 3'-Ende konnte nicht aus dem Abspaltungsmuster abgelesen werden und ist hier zunächst durch Vergleich mit der entsprechenden Sequenz der Anticodonschleife von  $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$  aus Maus-Myelomzellen vermutet worden. Der Beweis für das Vorliegen von Inosin erfolgte bei der Sequenzierung des RNAase A-Fragmentes IAC durch 5'-Endgruppenanalyse (siehe Abb. 10).

Oligonukleotid 4 = ACA(m<sup>5</sup>)CG

Eine Modifikation des Cytidins war aus der deutlichen Hemmung des sequentiellen Abbaus auf der Stufe des Tetranukleotids ACA(m<sup>5</sup>)C ersichtlich. Die Nukleotidanalyse (Abb. 5) ergab m<sup>5</sup>Cp als einzige mögliche Cytidinmodifikation.

Oligonukleotid 8 = U $\Psi$ CG

Die fast identischen elektrophoretischen Mobilitäten der Dinukleotide pUp $\Psi$  und p $\Psi$ pU (vgl. Oligonukleotid 3), die sich deutlich von der des Dinukleotides pUpU unterscheiden, ermöglichten die Identifizierung des Nukleosids  $\Psi$ . Im übrigen wurde dieses Tetranukleotid nach Methylierung des Uridins

zum Ribothymidin auf klassische Weise sequenziert (Abb. 22).

Oligonukleotid 9 =  $D(m^5)C(m^5)CCCC$

Die Modifikation der beiden Cytidine konnte mit der angewandten Methode nicht eindeutig bestätigt werden. Ein geringer Laufstreckenunterschied zu authentischem pDpC konnte nur als Hinweis gelten. Die Instabilität von Dihydrouridin im alkalischen Milieu (Ringöffnung) erschwerte zusätzlich die Sequenzanalyse (69, 70). Aus diesem Grunde war die Sequenzierung des Fragmentes mit zwei Dihydrouridinen  $DDAUCACm^2G$  (Abb. 7 a) zum Scheitern verurteilt. Doch sprachen das Auffinden der RNAase A-Fragmente AU, AC, GGD,  $m^2G\psi$  (Abb. 7 b), die 5'-Endgruppenanalyse (pD), sowie die Regeln der Basenpaarung für diese Sequenz (Abb. 11).

Oligonukleotid 10 =  $m^1AAACCG$

Das modifizierte Nukleotid  $pm^1A$  wurde durch die 5'-Endgruppenanalyse identifiziert. Beim partiellen Abbau zur Sequenzierung wurde die Endgruppe allerdings nicht gefunden. Das letzte noch sichtbare Abbauprodukt war das Dinukleotid  $pm^1ApA$ , das wegen der zusätzlichen positiven Ladung des  $m^1A$  identisch mit dem zugesetzten, im UV-Licht sichtbaren pA lief (71).

Oligonukleotid 13 =  $Gm^1AAAC$

Da das Dinukleotid  $pGpm^1A$  und die Endgruppe pG fast identisches elektrophoretisches Laufverhalten zeigten (siehe oben) konnten sie nicht getrennt werden und die Abspaltung von  $pm^1A$  war nicht direkt nachzuweisen. Jedoch mußte auf Grund der Sequenz

des Oligonukleotids 10 = m<sup>1</sup>AAACCG, das nach der Spaltung mit RNAase T<sub>1</sub> erhalten wurde, eine Sequenz ....Gm<sup>1</sup>AAAC für ein Oligonukleotid der RNAase A-Spaltung gefordert werden. Diese Forderung wurde nur durch das Oligonukleotid 13 erfüllt.

#### Oligonukleotid 6 = IAC (Anticodonsequenz)

Die Anticodonsequenz von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> wurde im Hinblick auf die Untersuchung der Codonerkennung dieser tRNA mit besonderer Sorgfalt ermittelt.

Die eindeutige Identifizierung des Inosins gelang durch Endgruppenanalyse zusammen mit authentischem pI als Vergleichssubstanz. Eine bessere Trennung von pI und pG wurde durch Verwendung der beiden Laufmittel E und G an Stelle der sonst üblichen Laufmittel A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> erreicht. In beiden Fällen war das radioaktiv markierte Nukleotid des 5'-Endes von IAC mit dem zugesetzten, im UV-Licht sichtbaren pI chromatographisch identisch (Abb. 10).

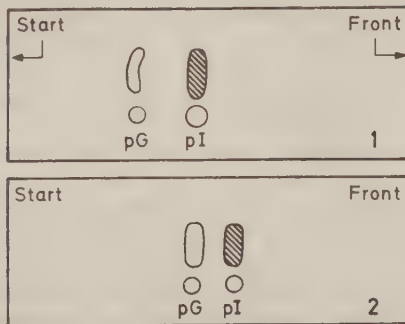


Abb. 10: Dünnschichtchromatographische Analyse der 5'-Endgruppe des Oligonukleotides 6 = IAC ( vgl. Abb. 7 und 9)

○ = im UV-Licht sichtbare authentische Nukleotide

▨ = nach Autoradiographie sichtbare Nukleotide

1 = Laufmittel E, 2 = Laufmittel G



C. 3. Codonerkennung von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber

Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. S. Nishimura in dessen Labor in Tokyo (National Cancer Center Research Institute) durchgeführt.

Die Ergebnisse des Ribosomenbindungstest mit den vier Valin-Tripletts GUU, GUC, GUA und GUG sind in Tab. 1 dargestellt.

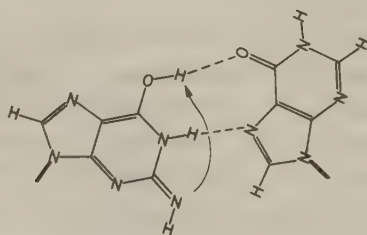
|                      |          | Bindung von Val-tRNA <sub>1</sub> <sup>Val</sup><br>an E.coli - Ribosomen<br>(Nullwert abgezogen) |             |
|----------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| ohne<br>Trinukleotid | 560 cpm  | = Nullwert                                                                                        |             |
| + GUU                | 2470 cpm | 1910 cpm                                                                                          | (0,69 pMol) |
| + GUC                | 1130 cpm | 570 cpm                                                                                           | (0,21 pMol) |
| + GUA                | 1010 cpm | 450 cpm                                                                                           | (0,16 pMol) |
| + GUG                | 3760 cpm | 3200 cpm                                                                                          | (1,15 pMol) |

Tab. 1: Bindung von Val-tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> an E.coli-Ribosomen (72).  
Das Reaktionsgemisch enthielt 0,1 M Tris/Acetat  
pH 7,2, 0,02 M Magnesiumacetat, 0,05 M KCl,  
1 A<sub>260</sub>-Einheit E.coli-Ribosomen und 6,91 pMol  
[<sup>14</sup>C]-Val-tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> (19300 cpm) in einem Endvolumen  
von 0,05 ml.

Der Versuch zeigte, daß tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber mit dem Anticodon IAC in vitro alle vier Valin-Codons mit einer deutlichen und unerwarteten Bevorzugung von GUG erkennen kann.

Dieser Befund steht im Widerspruch zur Wobble-Hypothese von Crick (20), nach der nur eine Wechselwirkung mit GUU, GUC und GUA erlaubt ist. Auf das Anticodon IAC angewendet besagt diese Hypothese nämlich, daß nur das zweite und dritte Nukleosid des Anticodons IAC (A und C) eine Standardbasenpaarung mit den beiden komplementären Nukleosiden des Codons eingehen, daß jedoch das Inosin in der ersten Position des Anticodons einen gewissen Spielraum hat, und neben der Standardbasenpaarung mit C auch sterisch mögliche Bindungen mit U und A eingehen kann. Dadurch können synonyme Codontripletts durch ein und dasselbe Anticodon erkannt und abgelesen werden. Eine Wechselwirkung des Inosins mit Guanosin ist jedoch ganz ungewöhnlich.

Die Möglichkeit eines I:G Basenpaares wurde von Topal und Fresco (73) auf Grund von Nukleosidmodellen vorgeschlagen (Abb. 12).



$G_{enol, imino} : I_{syn}$

Abb. 12: Struktur eines  $G_{enol, imino} : I_{syn}$  Basenpaares nach Topal und Fresco (73).

Die tautomere Guanosinform  $G_{enol, imino}$  könnte danach mit Inosin in syn-Konformation ohne nennenswerte Verzerrung der beiden Glycosylbindungen (und einer möglichen heliklen Anordnung) eine stabile Basenpaarung eingehen. Damit ist jedoch noch nicht erklärt, warum das Anticodon IAC von

$\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$  bevorzugt GUG erkennt. Der Anteil der tautomeren Form  $\text{G}_{\text{enol,imino}}$  und des syn-Isomeren von I im Gleichgewicht ist nicht bekannt. Die Natur der I:G Wechselwirkung sowie die sterische Anordnung der Nukleoside bleibt somit weiteren Untersuchungen überlassen.

Der einmalige Fall, daß ein Anticodon alle vier möglichen Codons erkennen kann, läßt den genetischen Code bei  $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$  zu einem zwei-Buchstaben-Code degenerieren. Der dritte Buchstabe scheint nur noch dazu zu dienen, das Leseraster einzuhalten, um ungewollte Mutationen durch Rasterverschiebung zu verhindern. Da sich der genetische Code aus einem ursprünglichen zwei-Buchstaben-Code zu einem drei-Buchstaben-Code entwickelt hat, ist der Raum für Spekulationen weit geöffnet.

Die ungewöhnliche Codonerkennung von  $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$  ist offenbar im Laufe der Evolution erhalten geblieben, denn Mitra et. al. fanden gleichzeitig dieselben Ergebnisse für  $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$  aus E.coli und Hefe (74). Sie benutzten für ihre Experimente die in vitro-Translation von MS2-RNA.

C. 4. Physikalisch-chemische Eigenschaften des 3'-Fragments von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> aus Kaninchenleber -  
Zahl und Art der Basenpaare im "TΨC"-Stamm

Bei den Diskelektrophoresen des nach "<sup>7</sup>G-Spaltung" von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> erhaltenen Gemisches war manchmal nach Anfärbung des Gels eine zusätzliche, höhermolekulare Bande zu erkennen, die anfänglich nicht erklärt werden konnte. Zur Bestimmung der Kettenlänge dieses Produktes wurde daher eine Diskelektrophorese zusammen mit verschiedenen langen RNAs als Vergleichssubstanzen durchgeführt. Da die Kettenlänge einer RNA logarithmisch von der Laufstrecke im Polyacrylamidgel abhängt, ist es möglich, die Länge unbe-

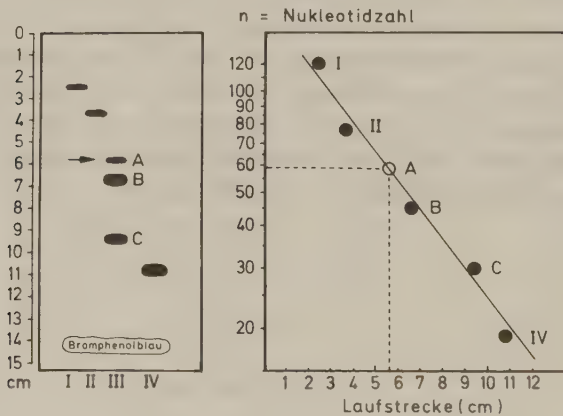


Abb. 13: Analytische Diskelektrophorese der "<sup>7</sup>G-Spaltprodukte" von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> (III) zusammen mit Vergleichsproben bekannter Kettenlänge in einem 11%igen Polyacrylamidgel. Der Pfeil kennzeichnet die bei manchen Spaltungen beobachtete zusätzliche Bande (A).  
links: I = 5 S RNA (n = 120), II = tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> (n=76), III = "<sup>7</sup>G-Spaltprodukte" von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub>, IV = Nonadeka-Nukleotid (n=19)  
rechts: Graphische Ermittlung der Kettenlänge von A aus der Laufstrecke  
A = zusätzliches Fragment unbekannter Natur  
B = 5'-Fragment von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> (n = 45)  
C = 3'-Fragment von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> (n = 30)

kannter Polynukleotide abzuschätzen (75, 76). Die Trennung der " $m^7$ G-Fragmente" und die graphische Ermittlung der Kettenlänge der unbekannten Bande sind in Abb. 13 dargestellt. Die Kettenlänge der zusätzlichen Bande A ( $n = 59$ ) ließ eine Dimerisation des 3'-Fragmentes ( $n = 30$ ) vermuten. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde das Gemisch der Fragmente 2 Minuten auf  $100^{\circ}\text{C}$  erhitzt, um alle Wasserstoffbrücken zu zerstören und dann schnell auf  $0^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, um eine erneute Dimerisation zu verhindern. Das Ergebnis der anschließenden diskelektrophoretischen Analyse ist in Abb. 14 gezeigt.

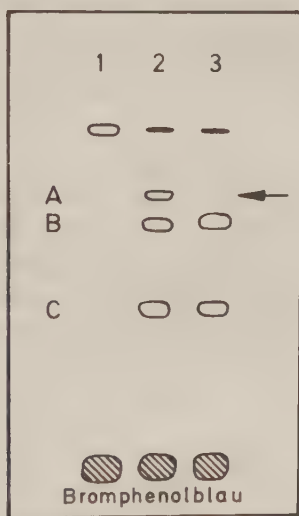


Abb. 14: Nachweis der Dimerisierungstendenz des 3'-Fragmentes von  $\text{tRNA}^{\text{Val}}$  durch Überführung der dimeren Form (A) in die monomere Form (C).

1.  $\text{tRNA}^{\text{Val}}$  als Vergleichsprobe
2. Die beiden " $m^7$ G-Fragmente" B und C mit der zusätzlichen Bande A (= Dimerisierungsprodukt von C)
3. Das gleiche Gemisch nach Erhitzen und Abschrecken.

Diskelektrophorese unter dissoziierenden Bedingungen in einem 11%igen Polyacrylamidgel.

Der Versuch bestätigte die Tendenz des 3'-Fragmentes zur Dimerisation. Bemerkenswert ist die hohe Stabilität des dimeren Fragmentes. Selbst unter den dissoziierenden Bedingungen der Diskelektrophorese (7 M Harnstoff) war das Dimere stabil. In einigen Gelen wurden sogar noch höhere nicht näher bestimmte Assoziationsformen dieses Fragmentes als schwächere Banden gefunden. Alle diese Formen konnten durch kurzzeitiges Erhitzen und Abschrecken in das monomere Fragment umgewandelt werden. Wie sich bei den Reinigungsschritten des kürzeren Fragmentes zeigte, entsteht die dimere Form beim Stehenlassen in Lösung bei Raumtemperatur aus dem monomeren 3'-Fragment. Beide Formen liegen offenbar in einem Gleichgewicht vor (Abb. 15).

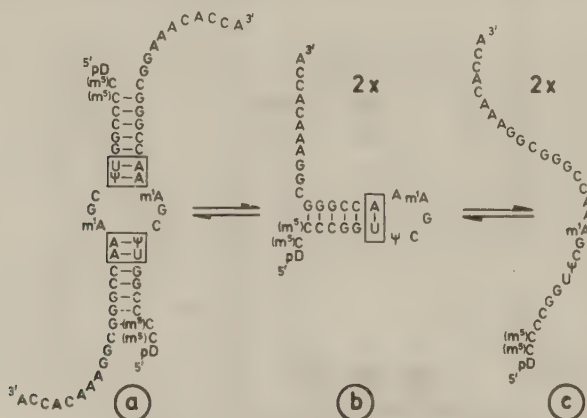


Abb. 15: Reaktionsschema für die Konformationsänderungen des 3'-Fragmentes von tRNA<sup>Val</sup>. Die monomere Form (b) steht bei Raumtemperatur im Gleichgewicht mit dem Dimeren (a). Durch Erhitzen entsteht der Einzelstrang (c). Neben den G:C Basenpaaren konnten in den beiden Formen a und b zusätzliche Basenpaare nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3), die durch Einrahmung hervorgehoben sind.

Die physikalisch-chemischen Untersuchungen am 3'-Fragment von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> zur Bestimmung der Zahl und Art der Basenpaare wurden von Prof. D. Riesner (Institut für physiologische Chemie, Medizinische Hochschule, Hannover) durchgeführt.

Mit Hilfe von Temperatursprungkinetiken und differenzierten Schmelzkurven bei zwei verschiedenen Wellenlängen (260 nm und 280 nm) konnte Riesner das Vorliegen eines zusätzlichen A:U Basenpaares neben den 5 G:C Paaren im monomeren 3'-Fragment nachweisen (Abb. 15).

Nach Dimerisation sind sogar noch je ein weiteres A:Ψ Basenpaar erkennbar (Abb. 15). Die erstaunliche Stabilität des dimeren 3'-Fragmentes beruht auf dem Vorliegen von 14 Basenpaaren ( 10 G:C, 2 A:U, 2 A:Ψ ).

Obwohl sich die Ergebnisse, die am monomeren 3'-Fragment von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> gewonnen wurden nicht bedenkenlos auf ganze tRNA übertragen lassen, waren sie dennoch ein wertvoller Hinweis. Die nachfolgenden Methylierungsexperimente an intakter tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> sollten weitere Daten über die Struktur der "TΨC"-Schleife dieser tRNA liefern.

C. 5. Methylierung von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber mit  
einer tRNA - Methylase-Fraktion aus E.coli

C. 5.1. Vorversuche zum Nachweis der Methylierbarkeit  
von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> mit E.coli-Methylase

Zur Durchführung der geplanten Experimente war es unbedingt erforderlich, eine spezifische Methyltransferase zur Verfügung zu haben, die in einer selektiven Reaktion nur das Uridin (U<sub>54</sub>) der "TΨC"-Schleife zu Ribothymidin (T<sub>54</sub>) methyliert.

Folgende Überlegungen zeigen, daß dazu möglicherweise keine aufwendigen Reinigungsschritte für die Enzympräparation notwendig sind.

Ein roher Extrakt aus E.coli enthält eine ganze Reihe unterschiedlicher Methyltransferasen, darunter auch die gesuchte U<sub>54</sub>-Methyltransferase. Da das Substrat tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus einem höherentwickelten Organismus stammt, dessen tRNA stärker modifiziert ist als tRNA aus E.coli, sollte für eine Methyltransferase aus E.coli nur das nichtmodifizierte U<sub>54</sub> methylierbar sein (77).

Es lag daher nahe, tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber mit einem Rohextrakt aus E.coli zu methylieren und die Spezifität des Methyleinbaus zu überprüfen. Eine Methylierungskinetik sollte zunächst zeigen, ob tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> mit einem Enzymrohextrakt aus E.coli überhaupt methylierbar ist (Abb. 16)

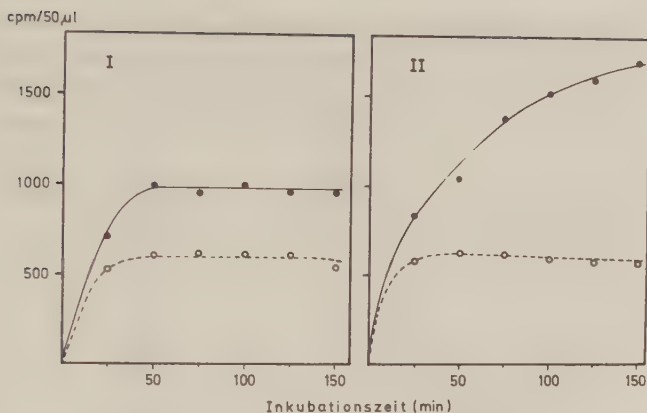


Abb. 16: Methylierungskinetik von  $tRNA_1^{Val}$  aus Kaninchenleber mit einem Enzymrohextrakt aus E.coli AB 301

Methyltdonor :  $[^{14}CH_3]$ -S-Adenosyl-L-Methionin  
(  $[^{14}CH_3]$ -Ado-Met )

I. mit 1 mM  $MgCl_2$  im Reaktionsansatz

II. mit 30 mM Cadaverin im Reaktionsansatz  
(Stimulierung der Methylierung)

○---○ = ohne zugesetzte tRNA

●—● = mit zugesetzter  $tRNA_1^{Val}$   
(0,15  $A_{260}$ -Einheiten pro 350  $\mu l$ )

Sowohl mit Magnesium als auch mit Cadaverin im Reaktionsansatz war ein deutlicher Methyleinbau nachweisbar. Das biogene Amin Cadaverin diente zur Stimulierung der tRNA-Methylierung (29, 78 - 80).

Um die Spezifität der verwendeten Methyltransferase zu überprüfen, war eine präparative Methylierung mit einer größeren Menge  $tRNA_1^{Val}$  erforderlich. Für die präparative Methylierung wurde die Reaktion in weiteren Versuchen bezüglich Enzymmenge und Cadaverinkonzentration optimiert, um maximalen Einbau zu erhalten (Abb. 17).

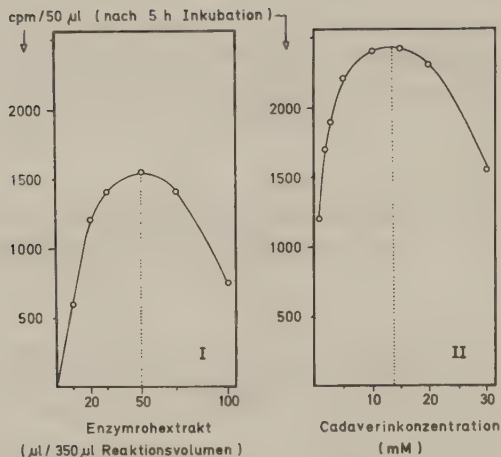


Abb. 17: Optimierung der enzymatischen in vitro-Methylierung von  $tRNA_{1}^{Val}$  aus Kaninchenleber mit einem E.coli-Rohextrakt.

- I. Bestimmung der optimalen Enzymmenge mit 30 mM Cadaverin im Reaktionsansatz.
- II. Bestimmung der optimalen Cadaverin-Konzentration mit 50 µl Enzymrohextrakt pro 350 µl Reaktionsvolumen.

Der maximal erzielbare Methyleinbau entsprach ungefähr 0,7 Methylgruppen pro eingesetzter  $tRNA_{1}^{Val}$ . Die präparative Methylierung von  $tRNA_{1}^{Val}$  aus Kaninchenleber mit E.coli-Enzym wurde unter den optimierten Bedingungen mit 12  $A_{260}^{-}$  Einheiten tRNA in einem Reaktionsvolumen von 28 ml durchgeführt. Nach neunstündiger Inkubation bei 37°C wurde die tRNA wie in den "Methoden" (E.2.5) beschrieben isoliert.

#### C. 5.2. Nukleotidanalyse der methylierten $tRNA_{1}^{Val}$

Ein Teil der methylierten  $tRNA_{1}^{Val}$  wurde mit RNAase  $T_2$  zu den Mononukleotiden gespalten. Diese wurden im Laufmittel  $A_2$  dünnstschichtchromatographisch aufgetrennt. Radio-

aktiv markierte, d.h. methylierte Nukleotide wurden durch Abschaben der Zellulose in schmalen Streifen (0.5 cm) und Bestimmung der Radioaktivität dieser Fraktionen im Szintillationszähler lokalisiert (Abb. 18).

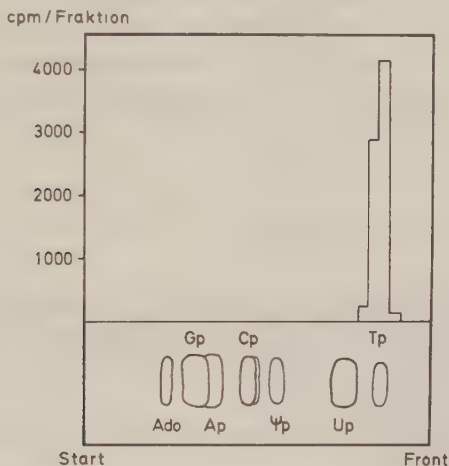


Abb. 18: Dünnschichtchromatographische Nukleotidanalyse (Laufmittel A<sub>2</sub>) von *in vitro* methylierter tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> aus Kaninchenleber nach Spaltung mit RNAase T<sub>2</sub>  
Enzym: Rohextrakt aus E.coli,  
Methyl donor: [<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>]- Ado-Met.  
oben: Verteilung der Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte (Dünnschichtscraper, 97)  
unten: im UV-Licht (254 nm) sichtbare authentische Nukleotide.

Auf der Dünnschichtplatte wurde nur ein einziges radioaktives Nukleotid als Reaktionsprodukt der enzymatischen Methylierung von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> mit E.coli-Methyltransferase gefunden. Die Lage der Radioaktivität stimmte mit der Lage des im UV-Licht sichtbaren authentischem Tp überein. Die endgültige Identifizierung gelang nach Rückgewinnung der radioaktiven Substanz von der Zellulose (aus der Szintillator-Zellulosesuspension), Behandlung mit alkalischer Phosphatase und erneuter Chromatographie zusammen mit authentischem T in zwei verschiedenen Laufmitteln (Abb. 19).

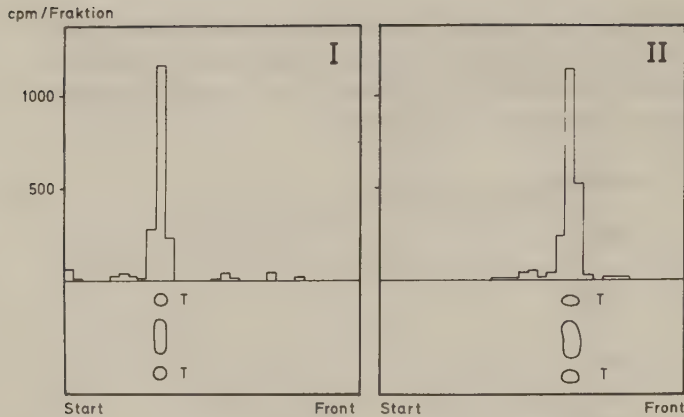


Abb. 19: Rechromatographie des isolierten radioaktiven Nukleotids (Abb. 18) nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase zusammen mit authentischem T.

I DC in Laufmittel C  
II DC in Laufmittel B

oben: Verteilung der Radioaktivität auf der DC-Platte (DC-Scraper, 97)  
unten: im UV-Licht (254 nm) sichtbares authentisches Ribothymidin (T).

### C. 5.3. Spaltung der methylierten $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ mit Ribonuklease $\text{T}_1$ zur Eingrenzung des Methylierungsortes

Die Nukleotidanalyse der methylierten  $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$  zeigte bereits eindeutig, daß Uridin durch Methylierung in Ribothymidin überführt worden war (Abb. 18, 19). Die genaue Zahl bzw. die Lage der methylierten Nukleoside ließen sich daraus nicht ableiten. Geht man jedoch von der Annahme einer Methylierung von  $\text{U}_{54}$  der "TΨC"-Schleife aus (Abb. 20 b), so sollte sich das radioaktive Nukleosid T nach Spaltung mit  $\text{RNAase T}_1$  (spezifische Spaltung nach G) allein im Tetranukleotid TΨCGp wiederfinden (Abb. 20 b). Da bei der  $\text{RNAase T}_1$ -Behandlung von  $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$  noch zwei weitere Tetranukleotide AAAGp und ΨUCGp entstehen, ist eine eindeutige Identifizierung



die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen. Wegen der großen Menge an nichtradioaktiver Träger-tRNA entsprach das Elutionsprofil dem von tRNA<sub>2</sub><sup>Tyr</sup> (81). Die geringen Mengen an tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup>-Fragmenten waren optisch nicht mehr nachweisbar (Abb. 21).

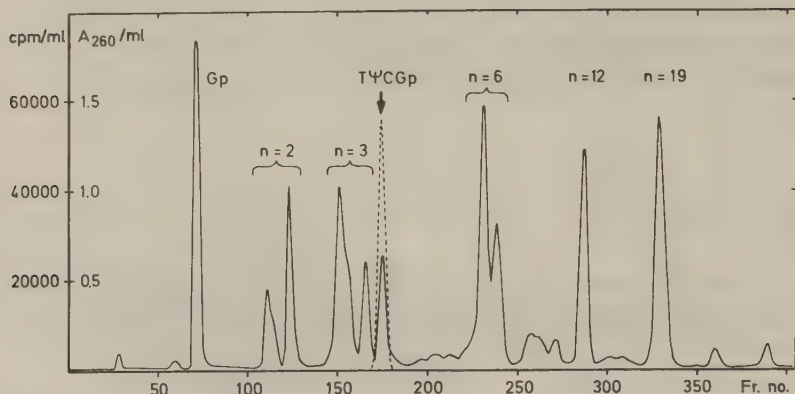


Abb. 21: Säulenchromatographie von  $[^{14}\text{CH}_3]$ -methylierter tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> (12 A<sub>260</sub>-Einheiten) mit tRNA<sub>2</sub><sup>Tyr</sup> als Träger (300 A<sub>260</sub>-Einheiten) nach Spaltung mit RNAase T<sub>1</sub> an DEAE-Zellulose (DE 23).

— = optische Dichte bei 260 nm

----- = Radioaktivitätsverlauf

Elution der Fragmente durch einen linearen Kochsalzgradienten von 0 - 0,4 M NaCl in 7 M Harnstoff.  
n = Kettenlänge der Fragmente

Im Elutionsprofil des RNAase T<sub>1</sub>-Hydrolysates von  $[^{14}\text{CH}_3]$ -methylierter tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> und nichtmethylierter tRNA<sub>2</sub><sup>Tyr</sup> aus E.coli wurde nur ein einziges radioaktives Fragment gefunden. Der Radioaktivitätsverlauf stimmte genau mit dem Verlauf der optischen Dichte (A<sub>260</sub>) des Tetranukleotides TΨCGp überein, was ein gutes Indiz für den angenommenen Ort der Methylierung in der "TΨC"-Schleife von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> war.

C. 5.4. Sequenzanalyse des methylierten Ribonuklease  
T<sub>1</sub>-Fragmentes von tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub>

Die radioaktiven Fraktionen der Säulenchromatographie des RNAase T<sub>1</sub>-Hydrolysates (Abb. 21) wurden gesammelt und über eine DEAE-Zellulose-Säule entsalzt. Ein kleines Aliquot wurde für die Sequenzierung eingesetzt.

Nach Abspaltung des 3'-Phosphates mit alkalischer Phosphatase und dünnschichtchromatographischer Reinigung wurde das Fragment mit Schlangengiftphosphodiesterase schrittweise vom 3'-Ende her abgebaut. Durch Isolation der Zwischenprodukte sowie der abgespaltenen Nukleotide konnte die Sequenz TΨCG des [<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>] -methylierten Fragmentes bestätigt werden. Die Auftrennung und Identifizierung der Spaltprodukte erfolgte durch Dünnschichtchromatographie zusammen mit authentischen Nukleotiden bzw. Nukleosiden (Abb. 22). Zur besseren Trennung der abgespaltenen Nukleotide von nichtgespaltenem Ausgangsmaterial war manchmal eine zusätzliche Behandlung mit alkalischer Phosphatase notwendig (Überführung der Nukleotide in die schneller laufenden Nukleoside).

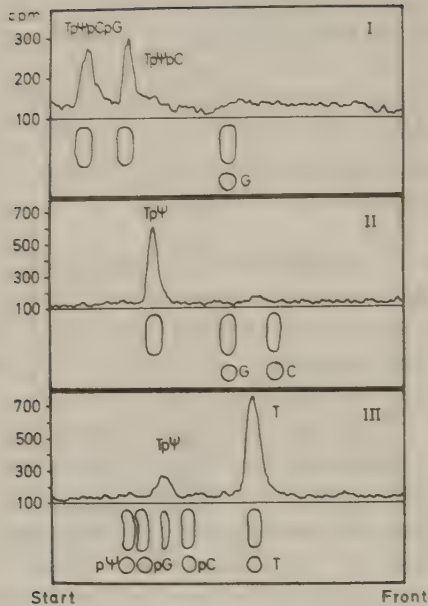


Abb. 22: Sequenzanalyse des  $[^{14}\text{CH}_3]$ -methylierten Tetranukleotides von  $\text{tRNA}^{\text{Ala}}$ , das nach Spaltung dieser tRNA mit RNAase  $\text{T}_1$  erhalten worden war (Abb. 21).

I. und II. Partialspaltungen des Fragmentes mit Schlangengiftphosphodiesterase und Überführung der abgespaltenen Nukleotide in die Nukleoside durch alkalische Phosphatase

III. vollständige Spaltung des Fragmentes. Trotz Enzymüberschuß war noch ein Rest ungespaltenes Dinukleotid  $\text{Tp}\psi$  nachweisbar.

Dünnschichtchromatographie im Laufmittel D

oben: Radioaktivitätsverteilung (DC-Scanner)

unten: im UV-Licht sichtbare Nukleotide und Nukleoside

Die Sequenz des radioaktiven Tetranukleotids geht direkt aus den drei Dünnschichtchromatogrammen hervor (Abb. 22). Als erstes Nukleotid wird pG abgespalten (3'-Ende), dann folgt pC. Schließlich wird das verbleibende Dinukleotid in T und  $\text{p}\psi$  gespalten. Demnach steht T am 5'-Ende des Tetranukleotids und die Sequenz lautet:  $\text{T}\psi\text{CGp}$ .

C. 5.5. Vergleichende spezifische  $U_{54}$ -Methylierung von  $tRNA_{1}^{Val}$  aus Kaninchenleber und  $tRNA$  aus  $T^{-}$  E.coli mit einer  $tRNA$ -Methyltransferase aus E.coli

In den vorhergehenden Abschnitten wurde die hohe Spezifität eines rohen E.coli-Extraktes für die Methylierung von  $U_{54}$  der "T $\Psi$ C"-Schleife von  $tRNA_{1}^{Val}$  gezeigt. Über das Vorliegen eines  $U_{54}:A_{60}$  Basenpaares in  $tRNA_{1}^{Val}$  kann jedoch nur dann eine zuverlässige Aussage gemacht werden, wenn man die Methylierbarkeit dieses  $U_{54}$  mit der Methylierbarkeit eines nichtbasengepaarten  $U_{54}$  einer anderen  $tRNA$  vergleicht. Als Vergleichssubstrat wurde unfraktionierte  $tRNA$  aus einer  $T^{-}$ -Mutante von E.coli gewählt. Bei dieser Mutante ist die in vivo-Methylierung von  $U_{54}$  zu  $T_{54}$  stark eingeschränkt und der größte Teil des  $U_{54}$  der Gesamt-tRNA ist nicht modifiziert. Unfraktionierte  $tRNA$  aus  $T^{-}$  E.coli ist daher in vitro ein gutes Substrat für die  $U_{54}$ -Methyltransferase aus anderen E.coli-Stämmen. Wesentlich für die folgenden Versuche ist die Tatsache, daß bei allen bisher bekannten  $tRNAs$  aus E.coli dem  $T_{54}$  ( $U_{54}$ ) der "T $\Psi$ C"-Schleife ein Pyrimidin gegenübersteht (vgl. Abb. 1), das eine Basenpaarung verhindert.

Ein Vergleich der Methylierbarkeit von  $tRNA_{1}^{Val}$  und  $tRNA$  aus  $T^{-}$  E.coli mit dem rohen E.coli-Enzym unter identischen Bedingungen sollte Schlüsse auf die Reaktivität und damit auf die Zugänglichkeit des  $U_{54}$  in beiden  $tRNA$ -Spezies zulassen.

Zusätzliche Informationen über die Struktur der "T $\Psi$ C"-Schleife können aus dem Einfluß von  $Mg^{++}$  bzw. Cadaverin auf die Methylierbarkeit von  $U_{54}$  gewonnen werden. Wie D. Wildenauer zeigen konnte (29, 83), sind die Wirkungen von  $Mg^{++}$  bzw. Cadaverin auf das Substrat  $tRNA$  gegensätzlicher Natur. Während  $Mg^{++}$  die  $tRNA$ -Struktur stabilisiert, bewirkt das biogene

Amin Cadaverin ein Auffalten der Tertiärstruktur.

Die Methylierungsversuche an tRNA aus  $T^-$  E.coli, tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> und dem 30 Nukleotide langen 3'-Fragment von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> mit einer rohen E.coli-Methyltransferase in Gegenwart von Mg<sup>++</sup> bzw. Cadaverin sind in Abb. 23 dargestellt.

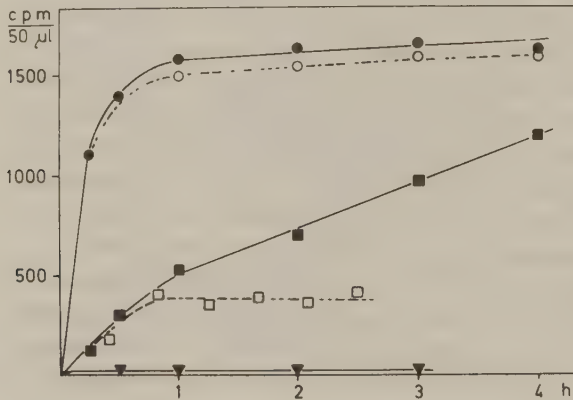


Abb. 23: Methylierung von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> (□, ■), 3'-Fragment von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> (▼) und tRNA aus  $T^-$  E.coli (○, ●) mit einem rohen E.coli-Enzym. Die Kurven zeigen reine tRNA-Methylierung (Abzug der in Kontrollversuchen ohne tRNA ermittelten Protein-methylierung).

Reaktionsbedingungen: ----- 1 mM Mg<sup>++</sup>  
 \_\_\_\_\_ 30 mM Cadaverin im  
 Reaktionsansatz, Methylndonor:  
 [<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>] - Ado-Met

Das 30 Nukleotide lange 3'-Fragment von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> konnte mit dem E.coli-Enzym nicht methyliert werden, es wird von der tRNA-Methyltransferase nicht mehr als Substrat erkannt.

Wie zuvor bewiesen worden war (Abb. 18, 21, 22), erfolgt mit dem verwendeten Enzymextrakt ausschließlich die Methylierung von U<sub>54</sub> in der "TΨC"-Schleife.

Abb. 23 zeigt einen drastischen Unterschied der Anfangsgeschwindigkeit der Methylierung zwischen tRNA aus  $T^-$  E.coli und tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Rattenleber (10 : 1) unter identischen Bedingungen. Dies läßt eine verringerte Zugänglichkeit von U<sub>54</sub> in tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> vermuten. Noch aufschlußreicher ist der Einfluß von Mg<sup>++</sup> bzw. Cadaverin auf die Methylierung. Bei tRNA aus  $T^-$  E.coli ist kein wesentlicher Unterschied ersichtlich. Sowohl mit Cadaverin als auch mit Magnesium im Reaktionsansatz sind die Methylierungsgeschwindigkeit, als auch der Methylierungsgrad von U<sub>54</sub> identisch. Dieses Ergebnis zeigt, daß das U<sub>54</sub> in tRNA aus  $T^-$  E.coli unter beiden Reaktionsbedingungen (Mg<sup>++</sup>, Cadaverin) frei zugänglich ist. Die Auffaltung der tRNA in Gegenwart von Cadaverin kann daher keinen erhöhten Methyleinbau bewirken. Gleichzeitig ist mit diesem Kontrollversuch jegliche Stimulierung der U<sub>54</sub>-Methyltransferase durch Mg<sup>++</sup> bzw. Cadaverin ausgeschlossen.

Ganz anders sind die Verhältnisse bei tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup>. Diese tRNA kann in Gegenwart von Mg<sup>++</sup> nur zu einem geringen Grade methyliert werden, während Cadaverin die Methylierung von U<sub>54</sub> deutlich stimuliert. Dieser Unterschied muß auf einer unterschiedlichen Struktur der "TΨC"-Schleife und einer eingeschränkten Zugänglichkeit von U<sub>54</sub> bei tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> beruhen. In Gegenwart von Mg<sup>++</sup> wird diese Struktur stabilisiert (geringer Methyleinbau), durch Cadaverin jedoch destabilisiert (erhöhter, linear ansteigender Methyleinbau).

Das Vorliegen eines zusätzlichen U<sub>54</sub>:A<sub>60</sub> Basenpaares im 3'-Fragment (vgl. Abschnitt C 4, Abb. 15), sowie die Methylierungsexperimente an intakter tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> sind zusammengekommen gute Beweise für eine auf 5 Nukleotide verkleinerte "TΨC"-Schleife und einen um ein A:U Basenpaar verlängerten "TΨC"-Stamm (6 Basenpaare) in tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber. Die allgemeine Regel (Abb. 1) der konstanten Länge von TΨC-Schleife (7 Nukleotide) und TΨC-Stamm (5 Basenpaare) für alle bisher bekannten tRNAs gilt somit nicht für tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup>.

C. 6. Versuche zur homologen enzymatischen Methylierung von U<sub>54</sub> in Leber - tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> mit einem Rattenleberextrakt in vitro.

C. 6.1. Analytische und präparative Methylierung von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> mit homologem Rattenleberenzym.

Die erfolgreiche Methylierung von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> in vitro mit einem rohen Enzym aus E.coli und S-Adenosyl-Methionin als Methyl donor wirft zwei Fragen auf:

1. Warum ist diese tRNA in vivo nicht am U<sub>54</sub> methyliert, während die Mehrzahl der anderen tRNAs an dieser Stelle zu T<sub>54</sub> methyliert sind?
2. Kann die Methylierung von Leber-tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> eventuell in vitro durch Stimulierung mit Cadaverin (78-80) mit einem homologen Enzymextrakt aus Rattenleber nachvollzogen werden?

Die erste Frage muß offen bleiben. Die Antwort auf die zweite Frage sollten die folgenden Methylierungsexperimente bringen.

Für die Methylierungsversuche der reinen tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> in vitro wurde ein Rohextrakt aus Rattenleber verwendet (84 - 87). Um möglichst keine Enzymaktivität durch Reinigungsschritte zu verlieren, wurde bei dieser Präparation auf die Säulenchromatographie mit DEAE-Zellulose verzichtet und bewußt geringe Mengen endogener tRNA in Kauf genommen. Das Ergebnis der analytischen Methylierungsversuche ist in Abb. 24 dargestellt.

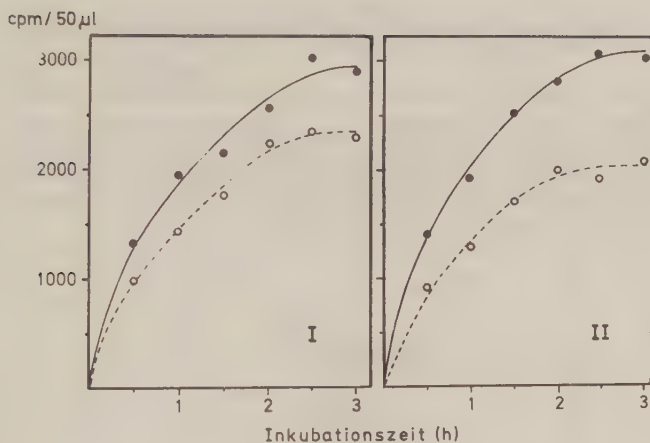
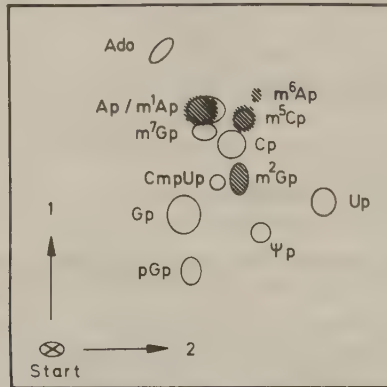


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf des Methyleinbaus in  $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Val}}$  mit einem Methyltransferaserohextrakt aus Rattenleber.  
Methyldonor:  $[\text{14CH}_3]$  - Ado-Met, Radioaktivität im TCA-fällbaren polymeren Material.  
I. mit 1 mM  $\text{Mg}^{++}$  im Reaktionsansatz  
II. mit 30 mM Cadaverin im Reaktionsansatz  
○---○ ohne zugesetzte  $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Val}}$   
●—● mit zugesetzter  $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Val}}$

Auffallend ist der hohe Methyleinbau in TCA-fällbares Material ohne zugesetzte  $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Val}}$ . Da die verwendete Enzympräparation nur ein Rohextrakt war, sind die unerwünschten Nebenreaktionen wie Proteinmethylierung und Methylierung endogener tRNA noch stark ausgeprägt. Ein Vergleich der beiden Experimente (Abb. 24, I und II) zeigt die Stimulierung des Methyleinbaus in tRNA durch das biogene Amin Cadaverin. Zur Analyse der entstehenden methylierten Nukleotide wurde eine präparative Methylierung von 3  $\text{A}_{260}$ -Einheiten  $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Val}}$  mit Cadaverin im Reaktionsansatz durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 7 ml, die Reaktionszeit war 3 Stunden bei 37°C.

### C. 6.2. Nukleotidanalyse der homolog methylierten tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup>

Die methylierte tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> wurde aus dem Reaktionsansatz isoliert und mit der Ribonuklease T<sub>2</sub> zu den Mononukleotiden gespalten. Die entstandenen Spaltprodukte wurden dünn-schichtchromatographisch untersucht (Abb. 25).



**Abb. 25:** Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie der RNAase T<sub>2</sub>-Spaltprodukte von in vitro mit Rattenleberenzym T<sub>2</sub> methylierter tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup>  
 Laufmittel: A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>  
 ○ = UV-Licht sichtbare Nukleotide  
 ■■■ = nach Autoradiographie sichtbare Nukleotide

Durch die dünn-schichtchromatographische Analyse konnten drei Hauptprodukte der enzymatischen Methylierung von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> mit Rattenleberenzym identifiziert werden:  
 m<sup>5</sup>Cp, m<sup>1</sup>Ap, m<sup>2</sup>Gp (84 - 87). Die geringe Menge an m<sup>6</sup>Ap ist wahrscheinlich durch eine Dimroth-Umlagerung (88 - 90) aus m<sup>1</sup>Ap bei der Aufarbeitung entstanden. Das erwartete Methylierungsprodukt Tp wurde nicht gefunden. Dies könnte zwei Gründe haben:

1. tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> ist auch in vitro wie in vivo aus noch unbekannten Gründen mit homologem Enzym aus Rattenleber nicht am U<sub>54</sub> zu methylieren, oder

2. Die gesuchte  $U_{54}$ -tRNA-Methyltransferase ist nicht in der verwendeten Enzympräparation vorhanden.

Um die Frage 2 zu beantworten, wurde nach einem geeigneten Substrat für diese Methyltransferase gesucht. Die Wahl fiel auf die bereits verwendete tRNA aus  $T^-$  E.coli.

C. 7. Versuche zur heterologen enzymatischen Methylierung von U<sub>54</sub> in tRNA aus T<sup>-</sup> E.coli mit einem Rattenleberenzym *in vitro*.

C. 7.1. Analytische und präparative heterologe Methylierung von tRNA aus T<sup>-</sup> E.coli mit Rattenleberenzym

Für die heterologen Methylierungsversuche wurde ein frischer Methyltransferaserohextrakt aus Rattenleber hergestellt (siehe "Methoden", E.2.3.). Diesmal wurde durch Chromatographie an DEAE-Zellulose endogene tRNA entfernt. Die analytischen Reaktionskinetiken sind in Abb. 26 gezeigt. Zur Kontrolle wurde neben tRNA aus T<sup>-</sup> E.coli auch normale E.coli-tRNA methyliert.

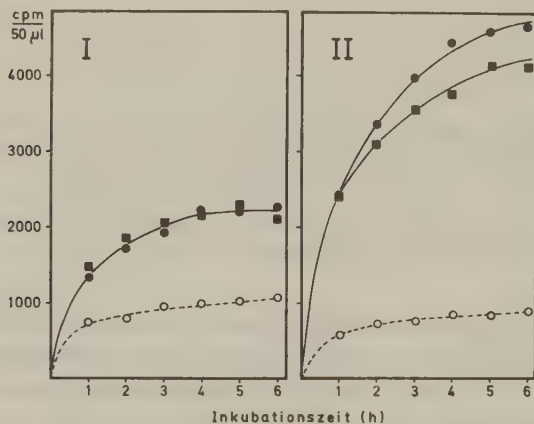


Abb. 26: Methylierung von tRNA aus T<sup>-</sup> E.coli und normaler E.coli-tRNA (Kontrolle) mit einem Enzymrohextrakt aus Rattenleber.  
Methyl donor: [<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>] - Ado-Met  
I. mit 1 mM<sup>+</sup> im Reaktionsansatz  
II. mit 30 mM Cadaverin im Reaktionsansatz  
○ --- ○ = ohne zugesetzte tRNA  
■ — ■ = mit zugesetzter tRNA aus T<sup>-</sup> E.coli  
● — ● = mit zugesetzter E.coli-tRNA

Die beiden Substrate E.coli-tRNA und tRNA aus  $T^-$  E.coli zeigten beide nahezu gleichen Methyleinbau. Bei Anwesenheit von Cadaverin im Reaktionsansatz war der Einbau in E.coli-tRNA sogar etwas größer als in die an sich methyldefizientere tRNA aus  $T^-$  E.coli (Abb. 26 II). Dieser Befund deutete bereits darauf hin, daß im Falle der tRNA aus  $T^-$  E.coli keine  $U_{54}$ -Methylierung stattgefunden hatte und daß bei beiden tRNAs andere Nukleoside als Uridin in etwa gleichem Ausmaß methyliert worden waren.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden je  $1,5 A_{260}^-$  Einheiten tRNA aus  $T^-$  E.coli mit  $Mg^{++}$  bzw. Cadaverin im Reaktionsansatz präparativ methyliert und einer Nukleotidanalyse unterzogen.

#### C. 7.2. Nukleotidanalyse der heterolog methylierten tRNA aus $T^-$ E.coli

Nach Spaltung der methylierten tRNA aus  $T^-$  E.coli mit der RNAase  $T_2$  wurden die Nukleotide durch Dünnschichtchromatographie im Laufmittel  $A_2$  getrennt und die Verteilung der Radioaktivität mit dem Dünnschicht-Scanner bestimmt (Abb. 27).

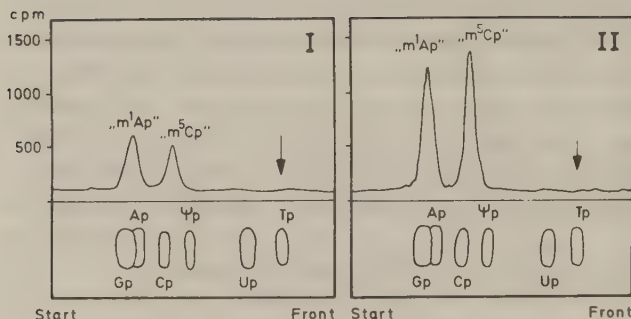


Abb. 27: Eindimensionale dünnschichtchromatographische Nukleotidanalyse (Laufmittel A<sub>2</sub>) von in vitro methylierter tRNA aus T<sup>-</sup> E.coli.

Methyltransferaserohextrakt aus Rattenleber,

Methyldonor : [ <sup>14</sup>CH<sub>3</sub> ]-Ado-Met.

I. 1 mM Mg<sup>++</sup> im Reaktionsansatz

II. 30 mM Cadaverin im Reaktionsansatz

oben: Radioaktivitätsverlauf (DC-Scanner)

unten: im UV-Licht sichtbare authentische Nukleotide.  
Bei der Methylierung war kein Tp entstanden (Pfeil).

Bei der heterologen Methylierung von tRNA aus T<sup>-</sup> E.coli mit einem rohen Rattenleberenzym war sowohl mit Mg<sup>++</sup> als auch mit Cadaverin kein radioaktives Tp entstanden (Pfeil, Abb. 27), statt dessen wurden beide Male in etwas unterschiedlichen Verhältnissen zwei radioaktive Nukleotide gefunden, die auf Grund ihres chromatographischen Laufverhaltens zunächst für m<sup>5</sup>Cp und m<sup>1</sup>Ap gehalten wurden.

Zur genauen Feststellung der Identität wurden beide radioaktiven Substanzen von der Dünnschichtplatte isoliert, mit alkalischer Phosphatase behandelt (Abspaltung des 3'-Phosphates) und in drei verschiedenen Laufmitteln zusammen mit authentischen Nukleosiden rechromatographiert (Abb. 28).

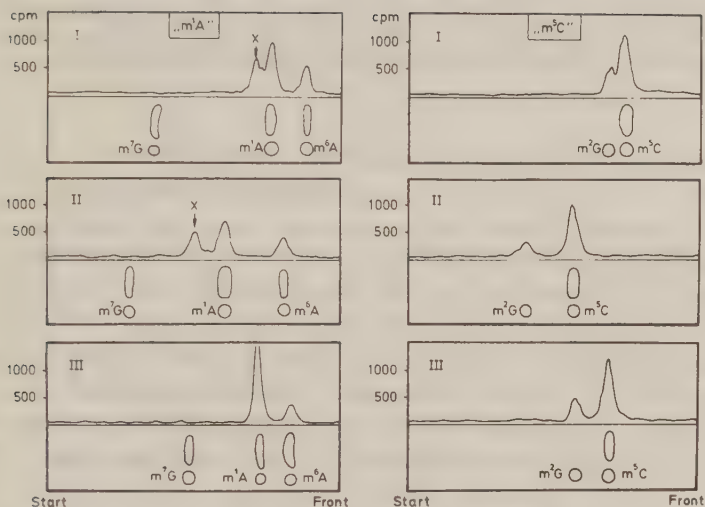


Abb. 28: Rechromatographie der radioaktiven Nukleotide " $m^1A$ p" bzw. " $m^5C$ p" (Abb. 27) nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase in drei verschiedenen Laufmitteln zusammen mit authentischen Vergleichssubstanzen.  
 I. Laufmittel E  
 II. Laufmittel F  
 III. Laufmittel D  
 oben: Radioaktivitätsverteilung (DC-Scanner)  
 unten: im UV-Licht sichtbare authentische Nukleoside  
 X = nicht identifizierbares methyliertes Nukleosid.

Die Rechromatographie der mit " $m^5C$ p" und " $m^1A$ p" bezeichneten radioaktiven Nukleotide nach Abspaltung des Phosphates mit alkalischer Phosphatase brachte deren Inhomogenität zum Vorschein.

Außer einem unbekannten Nukleosid konnten drei methylierte Nukleoside identifiziert werden. Wie bei dem vorhergehenden Experiment mit  $tRNA_{Val}^1$  als Substrat (Abb. 25) handelte

es sich dabei um  $m^1A$  (bzw.  $m^6A$ ),  $m^5C$  und  $m^2G$  (85, 87). Rattenlebermethyltransferasen methylieren somit  $tRNA_1^{Val}$  (Kaninchenleber) und  $tRNA$  aus  $T^-$  E.coli in gleicher Weise, jedoch in verschiedenem Ausmaß.

Das Mißlingen der Methylierung von  $U_{54}$  in  $tRNA_1^{Val}$  bzw.  $tRNA$  aus  $T^-$  E.coli mit einem rohen Rattenleberenzym legt die Vermutung nahe, daß eine solche Enzymaktivität in dem verwendeten rohen Rattenleberextrakt fehlt. Dieser Befund steht im Widerspruch zu der Tatsache, daß fast alle  $tRNAs$  aus Rattenleber am  $U_{54}$  methyliert sind ( $T_{54}$ ). Eine mögliche Erklärung bieten die Arbeiten von Rabinowitz und Kersten, die zeigten, daß die  $U_{54}$ -Methyltransferase in *S.faecalis* bzw. *B.subtilis* nicht S-Adenosyl-Methionin sondern ein Tetrahydrofolsäurederivat als Methyl donor benötigt (37 - 42). Ähnliche Verhältnisse sind für die Leber möglich, jedoch nicht erwiesen.

C. 8. Versuche zur enzymatischen Methylierung von  
T<sub>54</sub> in E.coli-tRNA zu 2'-O-Methyl-Ribothymidin  
(Tm<sub>54</sub>) mit Rattenleberenzym in vitro

C. 8.1. Präparative Methylierung von E.coli-tRNA mit  
Rattenleberenzym

Die Entdeckung des seltenen Nukleosids 2'-O-Methyl-Ribothymidin (Tm) in diesem Labor in Position 54 von tRNA<sub>2</sub><sup>Lys</sup>, tRNA<sub>3</sub><sup>Lys</sup> und tRNA<sub>4</sub><sup>Lys</sup> an Stelle von T (53), war der Anlaß, nach einer Methyltransferase in Rattenleber zu suchen, die in der Lage ist, eine Methylgruppe auf die Ribose des Thymidins zu übertragen. Zwar waren die Versuche, eine Ado-Met-abhängige U<sub>54</sub>-Methyltransferase in Rattenleber zu identifizieren gescheitert, doch könnten die Verhältnisse bei der Ribosemethylierung anders sein.

Eine einfache und elegante Möglichkeit bot sich ausgehend von tRNA aus T<sup>-</sup> E.coli, die in vitro mit einem Enzym aus E.coli und [<sup>3</sup>H-CH<sub>3</sub>] -Ado-Met am U<sub>54</sub> methyliert worden war. Das Thymidin in Position 54 dieser tRNA ist somit radioaktiv markiert. Bei einer zweiten Methylierung mit Leberenzym und nicht-radioaktivem Ado-Met, jetzt an der Ribose des Thymidins, sollte bei der Nukleotidanalyse das [<sup>3</sup>H-CH<sub>3</sub>]-

Thymidin verschwinden und ein neues Methylierungsprodukt auftreten. Durch die erste Methylierung von U<sub>54</sub> zu [<sup>3</sup>H-CH<sub>3</sub>]-

Thymidin kann bei der nachfolgenden Methylierung gezielt und spezifisch die Ribosemethylierung am Thymidin verfolgt werden.

Die präparative Methylierung wurde mit je 0,25 A<sub>260</sub>-Einheiten [<sup>3</sup>H-CH<sub>3</sub>] -Thymidin-tRNA aus E.coli (5500 cpm) und nichtradioaktivem Ado-Met in einem Reaktionsvolumen von je 500 µl durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 1 mM Mg<sup>++</sup>, der

andere 30 mM Cadaverin. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C wurde die methylierte tRNA aus dem Reaktionsgemisch isoliert und nach Zugabe von 5 A<sub>260</sub>-Einheiten roher tRNA aus Rattenleber (Träger) der Nukleotidanalyse unterzogen.

#### C. 8.2. Nukleotidanalyse der methylierten tRNA aus E.coli

Die Nukleotidanalyse vollzog sich nach der bereits mehrfach beschriebenen Weise, durch Spaltung der tRNA mit RNAase T<sub>2</sub> und Dünnschichtchromatographie im Laufmittel A<sub>2</sub>.

Sehr nützlich zur Feststellung eines ribosemethylierten Tm<sub>54</sub> ist die Unfähigkeit der RNAase T<sub>2</sub>, die Phosphodiesterbindung zum benachbarten Nukleosid  $\Psi_{55}$  (Abb. 1) zu spalten. Die Methylierung an der Ribose verhindert nämlich die Bildung des intermediären 2'-3'-Zyklophosphates, das bei der Spaltung mit dieser Nuklease durchlaufen werden muß. Eine Ribosemethylierung des radioaktiv markierten T<sub>54</sub> sollte sich daher im Dünnschichtchromatogramm im Auftreten eines radioaktiven Dinukleotides Tmp $\Psi$ p bemerkbar machen. Zur Kontrolle wurde nichtmethylierte [<sup>3</sup>H-CH<sub>3</sub>]-Thymidin-tRNA aus E.coli ebenfalls mit RNAase T<sub>2</sub> gespalten (Abb. 29)

Nach der in vitro-Methylierung von [<sup>3</sup>H-CH<sub>3</sub>]-Thymidin-tRNA aus E.coli mit nichtradioaktivem Ado-Met als Methyltdonor und einer rohen Rattenlebermethyltransferase wurde bei der Nukleotidanalyse nur ein einziges radioaktives Nukleotid gefunden, das als unverändertes [<sup>3</sup>H-CH<sub>3</sub>]-Thymidin identifiziert wurde (Abb. 29)

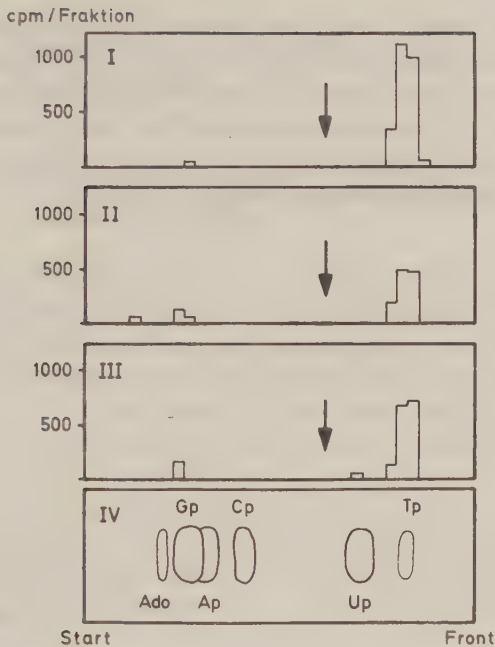


Abb. 29: Eindimensionale dünnschichtchromatographische Nukleotidanalyse von in vitro methylierter tRNA aus E.coli, deren T<sub>54</sub> radioaktiv markiert worden war : [<sup>3</sup>H-CH<sub>3</sub>]-Thymidin-tRNA. Rohe Methyltransferase aus Rattenleber, nichtradioaktives Ado-Met als Methyldonor. (Laufmittel: A<sub>2</sub>)

- I. Kontrollversuch mit nicht methylierter [<sup>3</sup>H-CH<sub>3</sub>]-Thymidin-tRNA aus E.coli
- II. Methylierung mit 1 mM Mg<sup>++</sup> im Reaktionsansatz
- III. Methylierung mit 30 mM Cadaverin im Reaktionsansatz
- I.-III. Verlauf der Radioaktivität (DC-Scraper, 97)
- IV. im UV-Licht sichtbare authentische Nukleotide. Der Pfeil kennzeichnet die Lage von authentischem TmpΨp.

In dem verwendeten rohen Rattenleberextrakt konnte somit keine Ado-Met-abhängige  $T_{54}$  zu  $Tm_{54}$  - Methyltransferase nachgewiesen werden. Möglicherweise ist das gesuchte Enzym, ebenso wie bei der  $U_{54}$ -Methyltransferase aus Rattenleber vermutet, nicht von Ado-Met, sondern von einem Tetrahydrofolsäurederivat als Methyl donor abhängig (35 - 42).

D        Ergebnisse und Diskussion Teil 2:  
         Viroid-Struktur (CPFV)

D. 1     Methylierungsversuche von CPFV mit verschiedenen  
         Methyltransferasen

Obwohl das eigentliche Ziel eine chemische Modifikation der Viroid-RNA mit Bisulfit war, sollte auch eine enzymatische Modifikation mit den vorhandenen tRNA-Methyltransferasen versucht werden. Ein positives Versuchsergebnis hätte auf eine tRNA-ähnliche Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des Viroids hingewiesen, wie es bei TMV-RNA gelungen ist (91).

Alle Versuche, Viroid (CPFV) mit tRNA-Methyltransferasen aus Rattenleber bzw. aus E.coli zu methylieren verliefen jedoch negativ.

D. 2.    Reaktionsmechanismus und Anwendung der Bisulfit-  
         modifikation von Nukleinsäuren

Die Einwirkung von Bisulfit auf RNA führt zu einer spezifischen Umwandlung von Cytidin zu Uridin. Diese Reaktion ist stark von der Sekundärstruktur der RNA abhängig. Wie verschiedene Arbeiten zeigten (57 - 61), kann nur nicht-basengepaartes Cytidin in Uridin überführt werden, während in den basengepaarten Bereichen der RNA die Modifikation nicht oder nur sehr langsam stattfindet.

Der Reaktionsmechanismus geht aus Abb. 30 hervor. Das nukleophile Bisulfit lagert sich reversibel an die 5,6-Doppelbindung von Uridin bzw. Cytidin an.

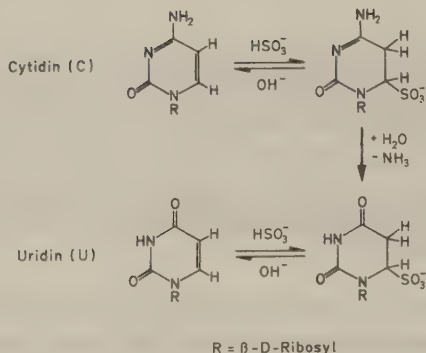


Abb. 30: Reaktionsmechanismus der Umwandlung von Cytidin zu Uridin mit Bisulfit (55, 56).

Während jedoch das Uridinadditionsprodukt bei saurem pH stabil ist, geht das Cytidinadditionsprodukt unter diesen Bedingungen sehr leicht durch irreversible Desaminierung in das Uridinaddukt über (55, 56). Das Bisulfit kann bei alkalischem pH leicht wieder abgespalten werden, sodaß schließlich alle reaktiven Cytidine in Uridine umgewandelt sind. Die Bisulfitmodifikation von RNA ist eine sehr gute Methode um einzelsträngige Bereiche von RNA zu identifizieren. Die großen Vorteile dieser Methode lassen sich wie folgt zusammenfaßen:

1. Hohe Basenspezifität: Nur Cytidin wird modifiziert, alle anderen Nukleoside bleiben unverändert.
2. Strukturspezifität: Die Modifikation erfolgt in nichtbasengepaarten Bereichen der RNA schnell und in basengepaarten Bereichen nicht oder nur sehr langsam.
3. Gut charakterisiertes und stabiles Modifikationsprodukt: Cytidin wird durch Bisulfit in Uridin umgewandelt, dessen elektrophoretisches

und chromatographisches Verhalten bekannt ist.

4. Äußerst milde Reaktionsbedingungen: Die Anlagerung von Bisulfit und die Desaminierung des Cytidinadduktes erfolgen sehr leicht bei niedrigen Temperaturen ( $5^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ) und pH 6. Zur Abspaltung des Bisulfits ist ein pH von 9 erforderlich. Im Bereich von pH 6 - pH 9 ist RNA völlig stabil.

Die Vorteile der Bisulfitmodifikation ließen es aussichtsreich erscheinen, dieses Verfahren auf Viroide anzuwenden, um einen Einblick in deren Sekundärstruktur zu erhalten.

Die hydrodynamischen Eigenschaften, die differenzierten Schmelzkurven sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Viroid-RNA haben zu einer ersten Modellvorstellung von der Struktur der Viroide geführt (19). Demnach liegt die ringförmige Viroid-RNA in nativer Form als starres hantelförmiges Molekül, mit einem weitgehend helikalen Mittelteil und nichtbasengepaarten Schleifen an den beiden Enden vor (Abb. 2). Die Bisulfitmethode sollte es ermöglichen, nach enzymatischer Fragmentierung der modifizierten Viroid-RNA (RNAase A, RNAase  $T_1$ ) einzelne Fragmente auf Grund ihrer Reaktivität einem der beiden Strukturelemente (Helix oder Schleife) zuzuordnen.

D. 3. Reaktionsbedingungen für die Modifikation von Viroid-RNA und Grundzüge der Fingerprintanalyse des modifizierten Viroids

Für die Modifikation von CPFV mit Bisulfit wurden drei verschiedene Bedingungen, ähnlich denen für tRNA bzw. 5 S RNA beschrieben (57, 61), gewählt (vgl.: Tab. 16):

1. 3 M  $\text{NaHSO}_3$ , 26 h,  $5^\circ\text{C}$ , 20 mM  $\text{Mg}^{++}$
2. 3 M  $\text{NaHSO}_3$ , 24 h,  $25^\circ\text{C}$  -
3. 3 M  $\text{NaHSO}_3$ , 96 h,  $25^\circ\text{C}$  -

1. Die Anwesenheit von 20 mM  $\text{Mg}^{++}$  zur Stabilisation der Sekundärstruktur, zusammen mit der niedrigen Reaktions-temperatur von  $5^\circ\text{C}$  sollte gewährleisten, daß wirklich nur einzelsträngige RNA-Bereiche reagieren und ein eventuelles Aufschmelzen der helikalen Bereiche ("flexible Regionen", Abb. 2) ausschließen.
2. Bei deutlich erhöhter Temperatur und ohne  $\text{Mg}^{++}$  sollten die einzelsträngigen schleifenförmigen Abschnitte der CPFV-RNA gut reagieren. Unter diesen Bedingungen ist möglicherweise mit einer teilweisen Öffnung und Reaktion der flexiblen Regionen zu rechnen.
3. Die Verlängerung der Reaktionszeit auf 96 Stunden sollte die Reaktion der einzelsträngigen Bereiche schließlich vervollständigen, sowie die Modifikation kurzer (instabiler) helikaler Strukturen ermöglichen.

Die Identifizierung der reaktiven Bereiche des Viroids wurde durch  $[^{32}\text{P}]$ -Fingerprints ermöglicht. Dazu wurde das modifizierte CPFV mit RNAase  $\text{T}_1$  bzw. RNAase A gespalten. Die entstandenen Oligonukleotide wurden mit Polynukleotid-5'-Kinase und  $\gamma$ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP am 5'-Ende phosphoryliert und zweidimensional aufgetrennt (1. Dimension: Hochspannungselektrophorese, 2. Dimension: Homochromatographie, siehe "Methoden", E.2.10.). Durch Vergleich der nach Autoradiographie erhaltenen Fingerprints von bisulfitmodifiziertem CPFV mit dem Fingerprint von unbehandeltem CPFV konnten diejenigen Oligonukleotide erkannt werden, bei denen eine Modifikation von Cytidin zu Uridin stattgefunden hatte. Da Uridin in der ersten Dimension, der Hochspannungselektrophorese, wesentlich schneller wandert als Cytidin, führt jede C zu U-Modifikation in einem C-haltigen Oligonukleotid zu einem sprunghaften Ansteigen der Wanderungsgeschwindig-

keit dieses Oligonukleotids und damit zu einer deutlich sichtbaren Verschiebung im Fingerprint. Bei der in dieser Arbeit gewählten Darstellung sind alle modifizierten Oligonukleotide an einer Rechtsverschiebung erkennbar.

D. 4. Analyse der Ribonuklease A-Fingerprints von bisulfitmodifiziertem CPFV und Klassifizierung der Oligonukleotide auf Grund ihrer Modifizierbarkeit

Da jedes der RNAase A-Fragmente nur ein Uridin oder Cytidin am 3'-Ende enthalten kann, ist die Identifizierung der modifizierten Oligonukleotide auf Grund ihrer einfachen Verschiebung nach rechts leicht möglich (siehe Pfeile, Abb. 31).

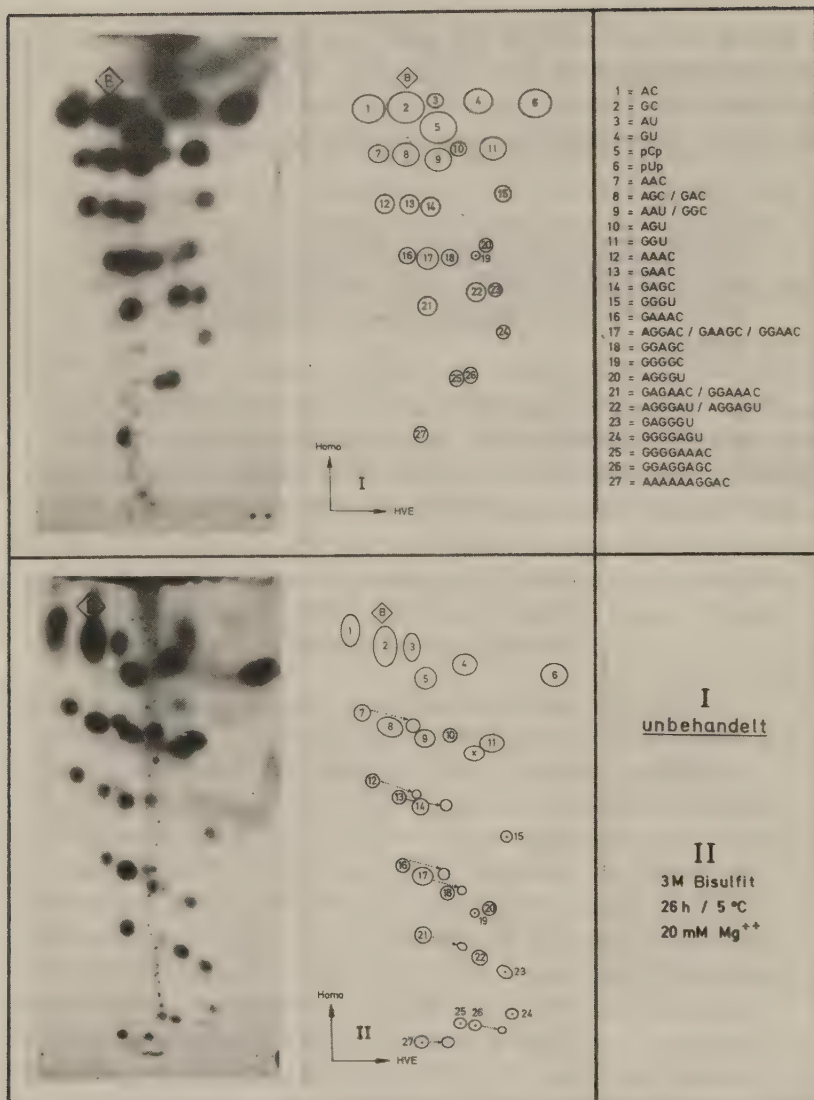
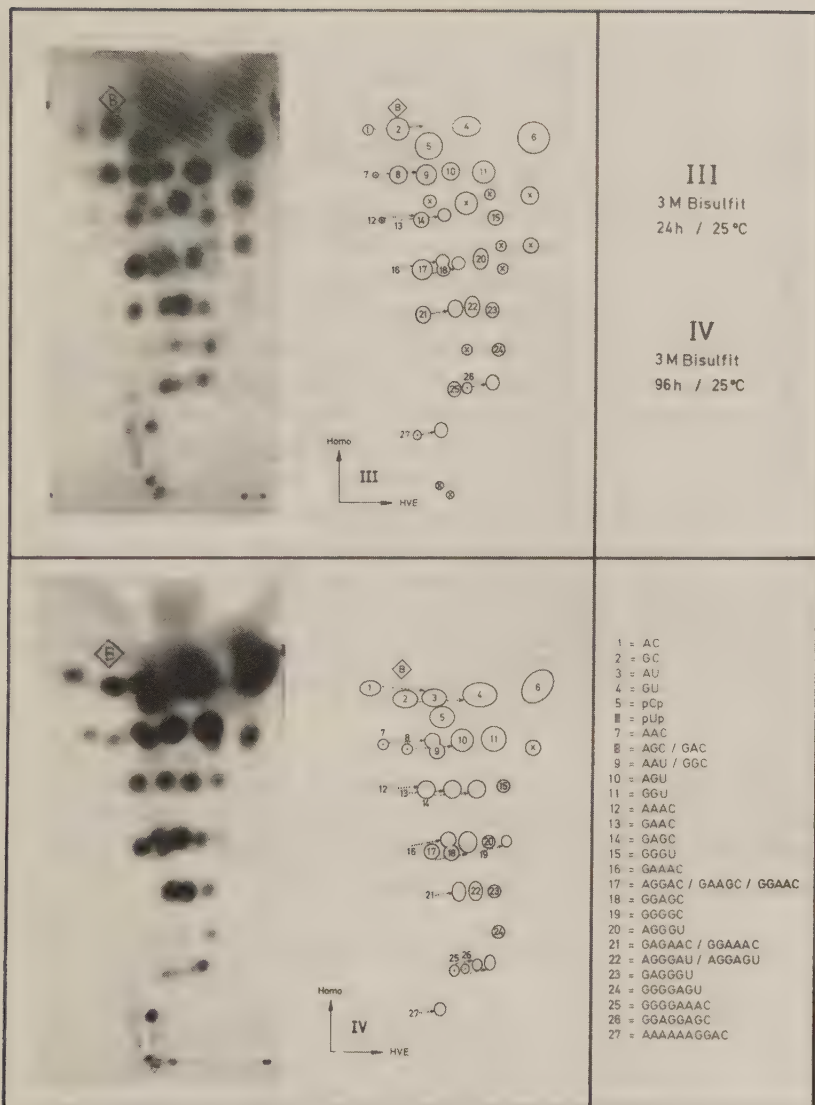


Abb. 31: Fingerprints von CPFV nach Spaltung mit RNAase A.  
 I. unbehandeltes CPFV  
 II. - IV. bisulfitmodifiziertes CPFV bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.  
 Die Sequenzen der RNAase A-Fragmente von unbehandeltem CPFV wurden von H. Domdey ermittelt.



Die gestrichelten Pfeile geben die Verschiebung derjenigen RNAase A-Fragmente an, deren 3'-Cytidin durch Bisulfit in 3'-Uridin umgewandelt wurde. Zum Beispiel geht Oligonukleotid 12 = AAAC in AAAU über.  
X = Oligonukleotide, die nicht identifiziert oder zugeordnet werden konnten.

Der "Verschiebungsvektor" nimmt von unten nach oben wegen der geringer werdenden Kettenlänge der Oligonukleotide zu (vgl. Oligonukleotide 27 und 1, Abb. 31), ist jedoch bei Oligonukleotiden gleicher Kettenlänge, die auf einer Höhe liegen, konstant (Oligonukleotide 12, 13, 14, Abb. 31). Alle Verschiebungsvektoren laufen annähernd parallel von links nach rechts. Abweichungen davon sind auf Verzerrungen durch die Homochromatographie zurückzuführen. Durch Vergleich aller vier Fingerprints (Abb. 31, I-IV) und Abschätzung der Intensitäten der einzelnen modifizierten Oligonukleotide läßt sich die Reaktivität der Cytidine in den einzelnen Oligonukleotiden abschätzen und klassifizieren. Das Cytidin in Oligonukleotid 27 reagiert beispielsweise sehr schnell. Bereits bei Bedingung II sind etwa 50% umgewandelt und nach 96 Stunden Bisulfitbehandlung (Abb. 31, IV) ist kein Ausgangsprodukt mehr sichtbar. Ganz anders verhält sich Oligonukleotid 25. Unter den Reaktionsbedingungen II und III ist das 3'-Cytidin noch völlig intakt (unverändertes Ausgangsmaterial). Erst nach der 96stündigen Bisulfitbehandlung läßt sich eine etwa 30%ige Umwandlung von C in U feststellen.

Sorgfältige Analysen dieser Art wurden für die meisten Oligonukleotide durchgeführt. Das Ergebnis ist eine willkürliche Klassifizierung der Fragmente von CPFV auf Grund ihrer Modifizierbarkeit mit Bisulfit (Abb. 32).

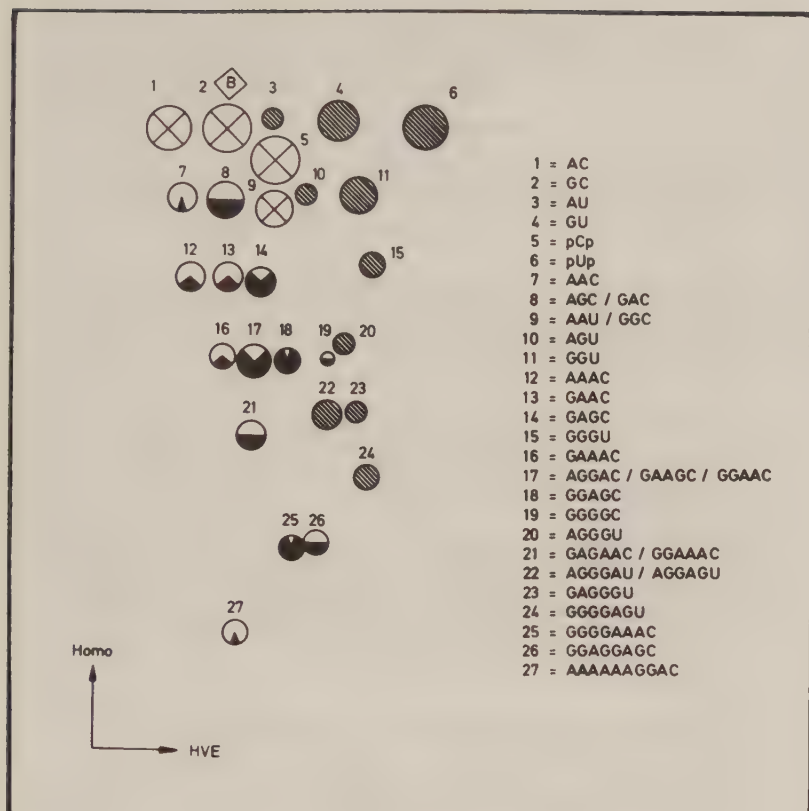


Abb. 32: Klassifizierung der Reaktivität des 3'-ständigen Cytidins der RNAase A-Fragmente bei der Bisulfit-modifikation.

● = Fragment enthält kein C und unterliegt daher keiner Modifikation.

⊗ = Fragment wurde nicht klassifiziert.

Modifizierbarkeit des 3'-Cytidins (willkürliche Abstufung durch Vergleich der Reaktivitäten):

▲ = sehr leicht

● = schwer

● = leicht

● = sehr schwer

● = mittel

● = nicht

Problematisch ist die vorgenommene Klassifizierung bei denjenigen Fragmenten, die zwar als ein sichtbarer "Fleck" erscheinen, sich bei der Sequenzierung jedoch als Gemische von Oligonukleotiden gleicher Bruttozusammensetzung erwiesen (z.B. Oligonukleotide 8, 17, 21; Abb. 32). Hier ist eine Aufsplitterung der Gesamtreaktivität in die interessanten Einzelreaktivitäten natürlich nicht möglich.

Die Analyse der RNAase A-Fingerprints von modifiziertem CPFV konnte aus folgenden Gründen ohne größere Schwierigkeiten durchgeführt werden:

1. Die RNAase A-Fingerprints sind relativ einfach aufgebaut, da alle Oligonukleotide gleicher Kettenlänge auf einer Höhe liegen.
2. Der RNAase A-Fingerprint von unbehandeltem CPFV umfaßt nur 27 trennbare Oligonukleotide, von denen etwa 1/3 auf Uridin endigen, also durch Bisulfit nicht modifizierbar sind.
3. Jedes der modifizierbaren Oligonukleotide enthält nur ein 3'-Cytidin. Daher ist nur eine einzige Umwandlung (C zu U) möglich.

D. 5. Analyse der Ribonuklease T<sub>1</sub>-Fingerprints von  
bisulfitmodifiziertem CPFV

D. 5.1. Identifizierung und Sequenzierung modifizierter  
Oligonukleotide

Wesentlich größere Schwierigkeiten als die RNAase A-Fingerprints von bisulfitmodifiziertem CPFV bereitete die Analyse der RNAase T<sub>1</sub>-Fingerprints. Im Gegensatz zum RNAase A-Fingerprint ist der RNAase T<sub>1</sub>-Fingerprint von unbehandeltem CPFV mit seinen fast 40 trennbaren Fragmenten wesentlich komplizierter. Dazu kommt noch die Tatsache, daß die einzelnen Oligonukleotide oft mehr als ein modifizierbares Cytidin enthalten. Als Folge davon sind in den Fingerprints der modifizierten CPFV-RNA oft mehrere Umwandlungsprodukte sichtbar, die umso weiter nach rechts verschoben sind, je mehr Cytidin im Oligonukleotid zu Uridin umgewandelt wurde (Abb. 33).

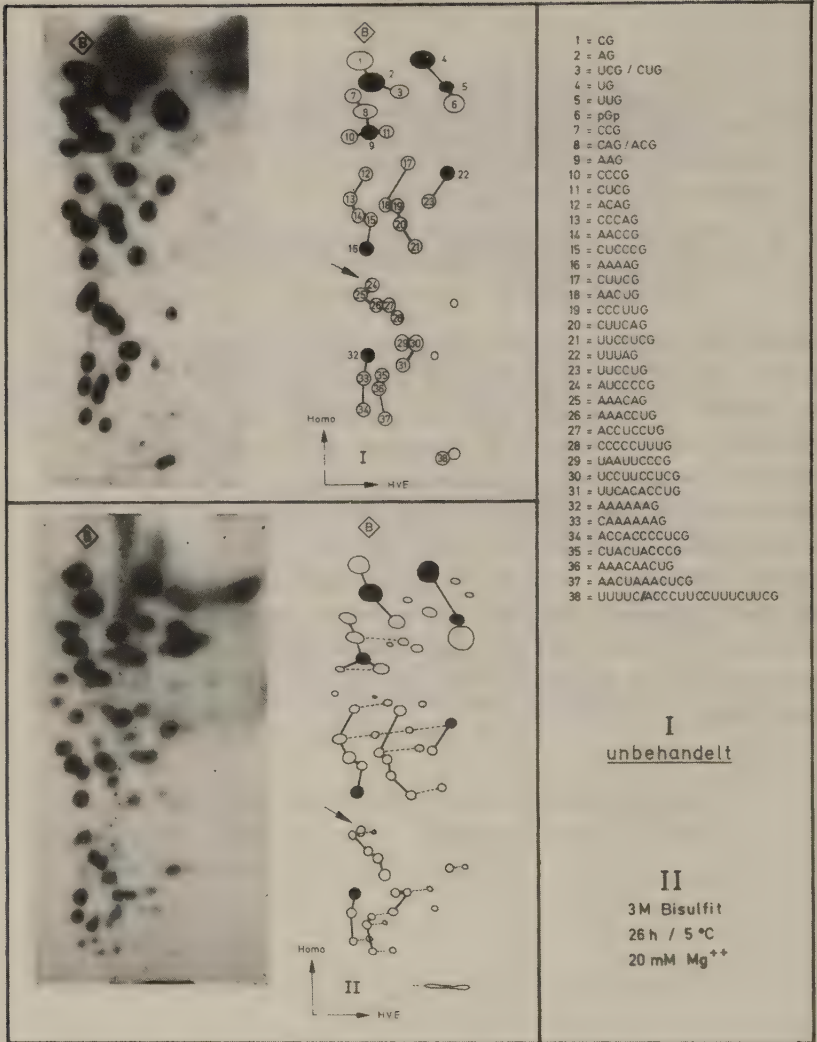
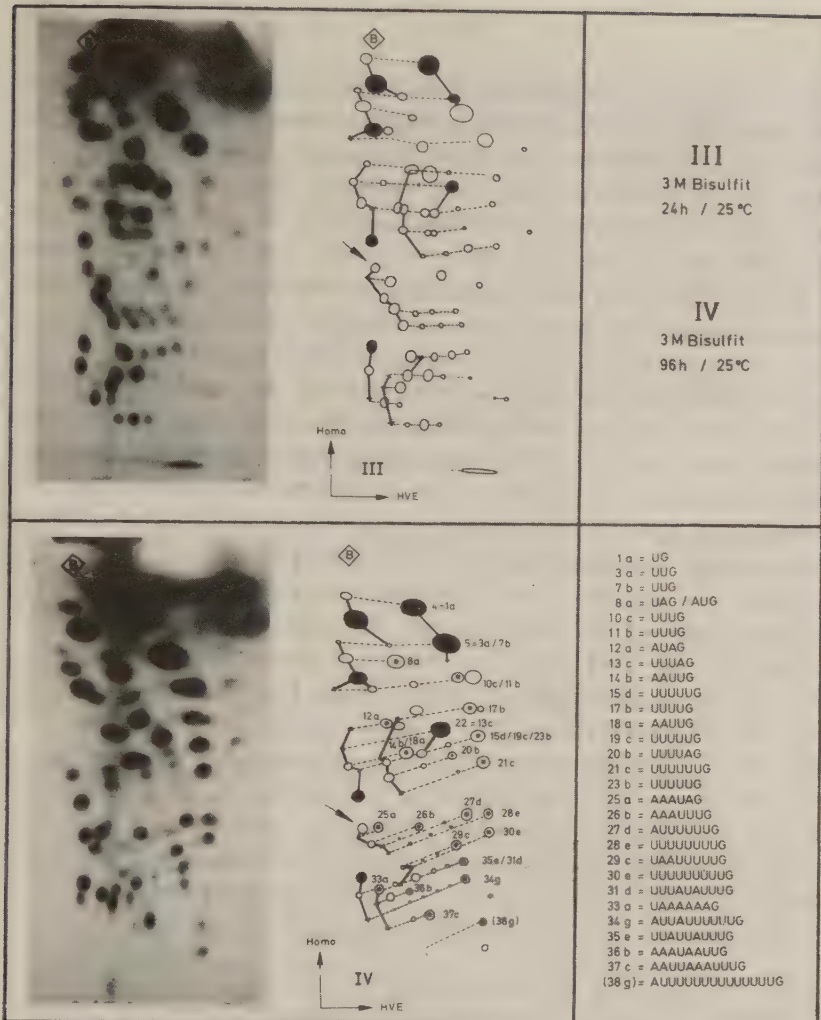


Abb. 33: Fingerprints von CPFV nach Spaltung mit RNAase T<sub>1</sub>  
 I. unbehandeltes CPFV.

Um die Orientierung bei den nachfolgenden Fingerprints von modifiziertem CPFV zu erleichtern, sind die einzelnen Oligonukleotide willkürlich mit durchgezogenen Linien zu "Sternbildern" verbunden worden. Die Sequenzen der RNAase T<sub>1</sub>-Fragmente von unbehandeltem CPFV wurden von H.Domdey ermittelt.

II.-IV. Bisulfitmodifiziertes CPFV bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

Die gestrichelten Linien geben die Verschiebungsvektoren an. Die durchgezogenen Linien geben die



ursprüngliche Oligonukleotidkonstellation an ("Sternbilder"). Der Zusammenhang von modifizierten Oligonukleotiden mit den entsprechenden Oligonukleotiden des unbehandelten CPV ist durch die gleiche Nummerierung hergestellt worden; die kleinen Buchstaben geben die Zahl der C zu U Modifikationen im Fragment an (a = 1, b = 2, c = 3 usw.).

● = Oligonukleotid enthält kein C und unterliegt daher keiner Bisulfitmodifikation.

⊙ = Oligonukleotid bei dem alle C vollständig in U umgewandelt worden sind.

Der Pfeil kennzeichnet das einzige völlig bisulfitresistente Oligonukleotid.

Die Gesamtverschiebung setzt sich dabei additiv aus den einzelnen Verschiebungsvektoren für je eine C zu U-Umwandlung zusammen. Bei den neu entstandenen Oligonukleotiden ganz rechts außen (⊙, Abb. 33, IV) sind alle möglichen Cytidine in Uridine überführt worden.

Um die zunächst nur rein graphisch ermittelten Zusammenhänge zwischen den modifizierten und den nichtmodifizierten Oligonukleotiden, die von H Domdey bereits sequenziert worden waren, zu beweisen, wurden alle in der Autoradiographie stark sichtbaren Endprodukte der Bisulfitmodifikation (⊙, Abb. 33, IV) sowie einige der gut getrennten Zwischenprodukte (Abb. 33, III) aus den Dünnschichtplatten eluiert und einem kontrollierten Abbau mit Nuklease  $P_1$  unterworfen. Die Hydrolysate wurden zweidimensional aufgetrennt und aus dem sich ergebenden Muster konnten mit Hilfe der Abspaltungsvektoren die Sequenzen eindeutig ermittelt werden (vgl. Abb. 34, 44). Die ermittelten Sequenzen für die Endprodukte der Bisulfitmodifikation sind in Abb. 33, IV aufgelistet. Die kleinen Buchstaben geben die Zahl der insgesamt erfolgten C zu U-Umwandlungen an (a=1, b=2, c=3, usw.). Die Nummerierung bringt die Verwandtschaft mit den unmodifizierten Oligonukleotiden (Abb. 33, I) zum Ausdruck. Beispielsweise leitet sich Oligonukleotid 21 c durch 3 C zu U-Modifikationen vom Oligonukleotid 21 des RNAase  $T_1$ -Fingerprints unbehandelter CPFV-RNA ab.

#### D. 5.2. Sequenzierung einiger unvollständiger modifizierter Oligonukleotide

Für diese Analysen kamen nur diejenigen Oligonukleotide in Frage, die sauber getrennt waren und in ausreichender Menge vorlagen. Einzeln sequenziert wurden daher folgende Oligonukleotide: 20a, 27a,b, 28a,b,c, 30a,b,c, 34a,b,c, 37a,b,c, (vgl. Abb. 33, III, IV).



die verschiedenen Cytidine nacheinander für das Bisulfitreagenz zugänglich. Ein Hinweis darauf, daß das Fragment 20 in einem basengepaarten Abschnitt des Viroids liegt, ist die geringe Reaktivität der beiden Cytidine.

D. 5.3. Klassifizierung der Reaktivität der Ribonuklease T<sub>1</sub>-Fragmente gegenüber Bisulfit mit ihrer Problematik

So wie bei den RNAase A-Fingerprints bereits erläutert wurde (Abb. 32), können auch die einzelnen Oligonukleotide der RNAase T<sub>1</sub>-Fingerprints bezüglich ihrer Reaktivität gegenüber Bisulfit klassifiziert werden (Abb. 35).

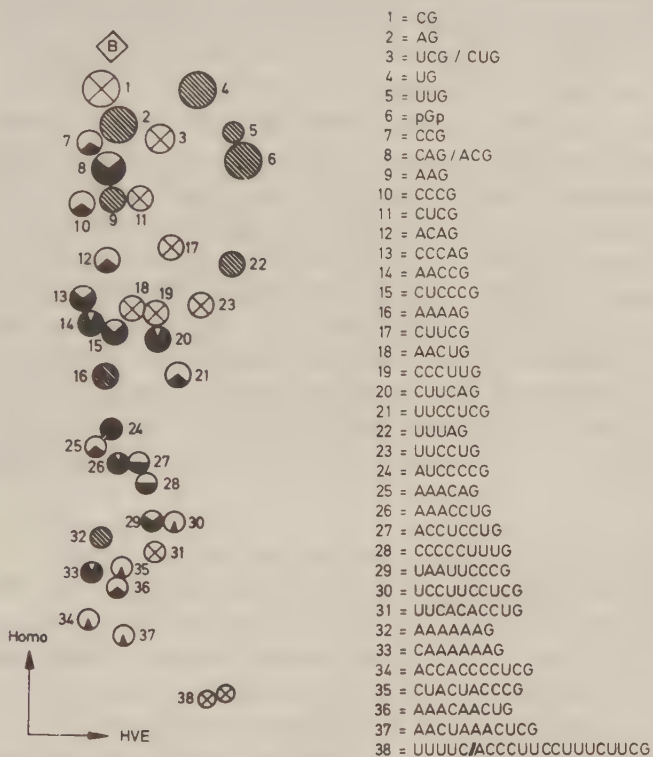


Abb. 35: Klassifizierung der RNAase T<sub>1</sub>-Fragmente von CPFV auf Grund der Reaktivität gegenüber Bisulfit. Die Reaktivität bezieht sich auf die Umwandlung des zuerst reagierenden Cytidins.

● = Fragment enthält kein C und unterliegt daher keiner Modifikation.

⊗ = Fragment wurde nicht klassifiziert.

Modifizierbarkeit des zuerst reagierenden Cytidins:

⬆ = sehr leicht

⬇ = schwer

⬇ = leicht

⬇ = sehr schwer

⬇ = mittel

● = nicht

Die Einteilung ist jedoch erschwert, da die meisten Fragmente des RNAase T<sub>1</sub>-Fingerprints mehr als ein Cytidin enthalten. Das kann zu Komplikationen führen, wenn die Cytidine desselben Fragmentes stark unterschiedliche Reaktivitäten aufweisen. Dies ist dann der Fall, wenn ein Teil des Fragmentes in einer Schleife vorliegt, während der andere Teil basengepaart ist. Um trotzdem zu einer Klassifizierung zu kommen, wurde bei allen Oligonukleotiden stets nur die erste Umwandlung betrachtet, d. h. es wurden die Mengenverhältnisse von unmodifiziertem Oligonukleotid und ersten Umwandlungsprodukt abgeschätzt und daraus die Reaktivität gegenüber Bisulfit abgeleitet. Die so gewonnenen Reaktivitäten müssen natürlich in den Einzelfällen mit deutlich unterschiedlicher Reaktivität der Cytidine korrigiert und aufgeschlüsselt werden.

Ein gutes Beispiel hierfür ist das RNAase T<sub>1</sub>-Fragment 36 (AAACAACUG, Abb. 33,I), dessen erstes Cytidin sehr leicht modifizierbar ist (Abb. 33, II,III), während das zweite nur langsam in U übergeht. Nach 96 Stunden Bisulfitbehandlung ist jedenfalls das erste Umwandlungsprodukt noch deutlich stärker vorhanden als das Endprodukt (Abb. 33,III,IV).

Es läßt sich sogar sagen, welches der beiden Cytidine das schnell reagierende und welches das langsam reagierende ist. Das RNAase T<sub>1</sub>-Fragment 36 (AAACAACUG) enthält nämlich das RNAase A-Fragment 7 (AAC), dessen 3'-Cytidin sehr leicht mit Bisulfit reagiert (vgl. Abb. 32).

Auf diese Weise ist eine genaue Aufschlüsselung der Bisulfitreaktivitäten bei diesem Fragment (AAACAACUG) möglich. Das linke Cytidin reagiert langsam, während das rechte Cytidin sehr schnell in Uridin umgewandelt wird.

D. 6. Verknüpfung von Ribonuklease T<sub>1</sub>- und Ribonuklease A-Fragmenten auf Grund ihrer Reaktivität gegenüber Bisulfit

Die unterschiedliche Spezifität der verwendeten Nukleasen ermöglichte es, RNAase T<sub>1</sub>-Fragmente mit entsprechenden Fragmenten der RNAase A-Spaltung zu verknüpfen, wenn identische überlappende Sequenzen vorhanden sind. Leider sind diese Verknüpfungen meistens mehrdeutig, d.h. es können mehrere RNAase A-Oligonukleotide mit mehreren RNAase T<sub>1</sub>-Oligonukleotiden kombiniert werden. Ein Vergleich der Reaktivitäten der Fragmente gegenüber Bisulfit kann in diesen Fällen manche Kombinationen ausschließen und auf diese Weise weiterhelfen (Tab. 2)

| Spaltung mit          | Fragment Nr. | Sequenz   | Reaktivitäts-Symbol (vgl. Abb. 32, 35 )                                            |
|-----------------------|--------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| RNAase A              | 16           | GAAAC     |   |
|                       | 21           | GGAAAC    |                                                                                    |
|                       | 25           | GGGGAAAC  |                                                                                    |
| RNAase T <sub>1</sub> | 25           | AAACAG    |  |
|                       | 26           | AAACUG    |                                                                                    |
|                       | 36           | AAACAACUG |                                                                                    |

Tab. 2: Verknüpfung von RNAase A-Fragmenten (oben) von CPFV mit entsprechenden RNAase T<sub>1</sub>-Fragmenten (unten) von CPFV, welche die Sequenz GAAAC gemeinsam haben. Die Pfeile geben die auf Grund der Reaktivitäten gegenüber Bisulfit möglichen Kombinationen an. Eingeklammerte Reaktivitätssymbole deuten an, daß sich die Reaktivität auf Oligonukleotidgemische bezieht, also mehrdeutig ist (Abb. 32, 35).

Das endständige Cytidin des RNAase A-Fragmentes 16 (GAAAC) ist leicht modifizierbar. Das entsprechende Cytidin in den RNAase T<sub>1</sub>-Fragmenten sollte daher ebenfalls dieselbe Reaktivität aufweisen, also leicht modifizierbar sein. Es ist offenkundig, daß daher eine Verknüpfung mit dem RNAase T<sub>1</sub>-Fragment 26 (schwer modifizierbar) ausscheidet und nur noch die Kombination mit den RNAase T<sub>1</sub>-Fragmenten 25 (AAACAG) bzw. 36 (AAACAACUG) erlaubt sind (Tab. 2).

Ein anderer Fall ist das 3'-ständige, schwer modifizierbare Cytidin des RNAase A-Fragmentes 25 (GGGGAAAC). Wegen der sehr leichten Modifizierbarkeit des Cytidins vom RNAase T<sub>1</sub>-Fragment 25 (AAACAG) ist eine Verbindung mit diesem Fragment von vornherein ausgeschlossen. Es bleiben daher nur noch die beiden Kombinationsmöglichkeiten mit den RNAase T<sub>1</sub>-Fragmenten 26 (AAACCUG) bzw. 36 (AAACAACUG). Hier scheint auf den ersten Blick die Verknüpfung mit dem RNAase T<sub>1</sub>-Fragment 26 wegen der geringeren Reaktivität wahrscheinlicher (Tab. 2), doch muß in diesem Fall die Anwesenheit von zwei Cytidinen berücksichtigt werden. Reagiert nämlich beim RNAase T<sub>1</sub>-Fragment 36 (AAACAACUG) zunächst das rechte Cytidin (schnelle Reaktion) und ist die Weiterreaktion des linken Cytidins durch Basenpaarung stark erschwert, so ist auch eine Verknüpfung mit diesem Fragment möglich. Wie in dem vorhergehenden Abschnitt gezeigt werden konnte (D.5.3.), ist in der Tat das linke Cytidin im Gegensatz zum rechten Cytidin in diesem Fragment schwer modifizierbar. Eine eindeutige Zuordnung des RNAase A-Fragmentes 25 zu einem der beiden RNAase T<sub>1</sub>-Fragmente 26 bzw. 36 ist daher nicht möglich.

Ein weiteres Beispiel für die Einschränkung der Kombinationsmöglichkeiten solcher RNAase A-Fragmente, die auf GAC endigen und solcher RNAase T<sub>1</sub>-Fragmente, die mit AC beginnen, durch Reaktivitätsvergleiche ist in Tab. 3 gegeben.

| Spaltung<br>mit                             | Fragment<br>Nr. | Sequenz    | Reaktivitäts-<br>symbol (vgl.<br>Abb. 32, 35 )                                        |
|---------------------------------------------|-----------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| RNAase A                                    | 8               | GAC        | (  ) |
|                                             | 8               | GAC        | (  ) |
|                                             | 17              | AGGAC      | (  ) |
|                                             | 27              | AAAAAAGGAC | (  ) |
| <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> |                 |            |                                                                                       |
| RNAase T <sub>1</sub>                       | 8               | ACG        | (  ) |
|                                             | 12              | ACAG       | (  ) |
|                                             | 27              | ACCUCCUG   | (  ) |
|                                             | 34              | ACCACCCUUG | (  ) |

Tab. 3: Verknüpfung von RNAase A-Fragmenten von CPFV (oben) mit entsprechenden RNAase T<sub>1</sub>-Fragmenten von CPFV (unten) welche die Sequenz GAC gemeinsam haben. Die Pfeile geben die auf Grund der Reaktivitäten gegenüber Bisulfit möglichen Kombinationen an. Eingeklammerte Reaktivitätssymbole deuten an, daß sich die Reaktivität auf Oligonukleotidgemische bezieht, also mehrdeutig ist.

Die Reaktivitätsbetrachtungen führen zu einer Verknüpfung des RNAase A-Fragmentes 27 (AAAAAAGGAC) mit einem der beiden RNAase T<sub>1</sub>-Fragmenten 12 (ACAG) oder 34 (ACCACCCUUG). Weitere Schlüsse können infolge mehrdeutiger Reaktivität nicht gezogen werden.

# D. 7. Rekonstruktion der stabilen doppelhelikalen Bereiche von CPFV

Während die leicht modifizierbaren Oligonukleotide die einzelsträngigen Bereiche von CPFV aufbauen, sollten die schwer modifizierbaren Fragmente in doppelhelikalen Anordnungen vorkommen. Mit Hilfe der Regeln der Basenpaarung und unter ausschließlicher Verwendung der schwer modifizierbaren RNAase T<sub>1</sub>- und RNAase A-Fragmente von CPFV wurde der Versuch unternommen, einzelne Abschnitte dieses doppelhelikalen Bereichs zu rekonstruieren (Tab. 4).

| rekonstruierte Doppelhelixabschnitte | RNAase T <sub>1</sub> - Fragmente                 | RNAase A- Fragmente                             |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                                      | (20) CUUCAG ●<br>(24) AUCCCCG ●<br>(26) AAACCUG ● | (22) AGGGAU ●<br>(25) GGGGAAC ●<br>(18) GGAGC ● |
|                                      | (29) UAAU UCCCCG ●                                | (24) GGGGAGU ●                                  |
|                                      | (15) CUCCCCG ●                                    | (23) GAGGGU ●                                   |
|                                      | (14) AACCG ●                                      | (11) GGU ●                                      |
|                                      | (13) CCCAG ●                                      | (15) GGGU ●                                     |
|                                      | (11) CUCG ⊗                                       | (14) GAGC ●                                     |

Tab. 4: Rekonstruktion der stabilen doppelhelikalen Bereiche mit den schwer bisulfitmodifizierbaren Oligonukleotiden unter Optimierung der Basenpaarung  
 durchgezogene Klammern: RNAase T<sub>1</sub>-Fragmente  
 gestrichelte Klammern: RNAase A-Fragmente  
 Reaktivitätssymbole siehe Abb. 32, 35

Eine optimale Basenpaarung ist in vielen Fällen nur unter Einbeziehung von G:U Basenpaaren möglich. Einzelne Störstellen bzw. kürzere Schleifen sind manchmal unvermeidbar.

Die oberste Anordnung der Tabelle 4 beruht auf den folgenden Voraussetzungen:

1. Ein Partialfragment von CPFV mit der Sequenz AGGGAUCCCCGGG wurde von C. Lossow tatsächlich gefunden.
2. Die Überlappung des RNAase A-Fragmentes 25 (GGGGAAAC) mit dem RNAase T<sub>1</sub>-Fragment 26 (AAACCUG) ist auf Grund der Reaktivitäten dieser Fragmente gegenüber Bisulfit wahrscheinlich (Tab. 2).
3. Eine befriedigende Basenpaarung ist nur bei der gewählten Anordnung gewährleistet.

Die einzelnen rekonstruierten Abschnitte ergeben mehrere doppelhelikale Strukturbereiche mit insgesamt 48 Basenpaaren. Die mögliche räumliche Anordnung dieser Strukturbereiche im Hantelmodell der Viroid-RNA wird in Abb. 38 und auf Seite 79 diskutiert.

D. 8. Schlußfolgerungen aus den beobachteten Reaktivitäten gegenüber Bisulfit für die CPFV-Sekundärstruktur

Betrachtet man alle Fingerprints von modifiziertem CPFV (Abb. 31 - 33, 35), so muß man feststellen, daß nur ein einziges Fragment, nämlich das RNAase T<sub>1</sub>-Fragment 24 (AUCCCCG) nach der 96 stündigen Bisulfitbehandlung noch völlig intakt ist und keinerlei Umwandlungsprodukt erkennbar ist (Abb. 33, Pfeil). Alle anderen Oligonukleotide sind, wenn auch zum Teil sehr langsam, modifiziert worden. Dieser Befund ist überraschend, wenn man sich das Hantelmodell von Riesner vor Augen hält (Abb. 2). Riesner fordert auf Grund von Berechnungen, die auf seinen thermodynamischen Messungen beruhen, einen ungestörten doppelhelikalen Bereich von mindestens 52 Basenpaaren (19) mit anschließenden kürzeren, ebenfalls doppelhelikalen Bereichen. Falls dieses Modell stimmt, dann sollten selbst nach 96 Stunden Bisulfitmodifikation noch zahlreiche RNAase T<sub>1</sub>-Fragmente (bzw. RNAase A-Fragmente) existieren, die völlig resistent gegen Bisulfit sind. Eine Erklärung für den Widerspruch zwischen der recht hohen Reaktivität des Viroids gegenüber Bisulfit und dem physikalischen Modell ist die, daß der lange ungestörte doppelhelikale Bereich dieses Modells nicht existiert, sondern daß immer wieder kürzere nichtbasengepaarte Abschnitte bzw. weniger stabile G:U Basenpaare eingeschoben sind (vgl. Tab. 4). Infolge dieser Störungen könnte der doppelhelikale Bereich bis auf einen kurzen stabilen Abschnitt destabilisiert sein. Wegen dieser Destabilisierung könnte die Bisulfit-Modifikation, die mit einer weiteren Destabilisierung verbunden ist, zum Teil wie das Öffnen eines Reißverschlusses ablaufen. Die sequentielle Modifikation des RNAase T<sub>1</sub>-Fragmentes 20 (CUUCAG) spricht für diese Vermutung (Abb. 34). Insgesamt kann somit die hohe Reaktivität des Viroids gegen Bisulfit erklärt werden.

D. 9. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CPFV vor und nach Bisulfitbehandlung

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Viroids wurden von Dr. G. Klotz und Prof. A.K. Kleinschmidt (beide Universität Ulm) angefertigt. Eine Aufnahme von nativem CPFV unter denaturierenden Bedingungen ist in Abb. 36 gezeigt.



Abb. 36: Elektronenmikroskopische Aufnahme von CPFV unter denaturierenden Bedingungen. Verschieden stark renaturierte Viroid-Moleküle (Aufnahme: Dr.G.Klotz und Prof.A.K.Kleinschmidt, Universität Ulm)

Auffallend ist das Vorliegen von drei verschiedenen Viroid-Formen:

1. offene Ringe, die zum Teil noch einen sehr kurzen Fortsatz oder Knoten aufweisen.  
Sie stellen die völlig denaturierte Viroid-Form dar.
2. "Tennis"-bzw. "Tischtennisschläger", die durch partielle Renaturierung der offenen Formen entstanden sind;

3. "Hanteln", bzw. "Stäbchen", die sich durch vollständige Renaturierung aus den Ringen zurückgebildet haben und die dem nativen Viroid entsprechen.

Durch die Bisulfitmodifikation von CPFV ändert sich das Verhältnis der Viroid-Formen stark zu Gunsten der offenen Ringe (Abb. 37).

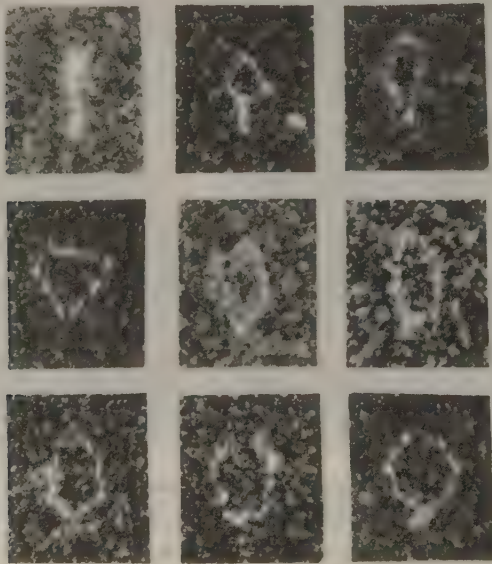


Abb. 37: Elektronenmikroskopisch sichtbare Formen von bisulfitbehandeltem CPFV (96 h, 25°C). Die meisten Moleküle lagen als offene Ringe vor, nur wenige als "Tennisschläger" und nur ein einziges der Population hatte Stäbchenform. (Aufnahme: Dr. G. Klotz und Prof. A.K. Kleinschmidt, Universität Ulm). Schwarzer Balken im unteren Bildteil = 1000 Å.

Die Abbildung 37 ist nur eine Auswahl der Viroid-Formen, die nach Bisulfitbehandlung zu beobachten waren. Die ganze Viroid-Population enthielt nur noch ein einziges "Stäbchen" und sehr wenig "Tennisschläger".

Die meisten Viroide lagen als offene Ringe, vielfach mit kurzen Fortsätzen oder Knoten vor. Bis auf einen sehr kurzen Abschnitt ist also die normale Basenpaarung im Viroid durch die Bisulfitmodifikation gestört worden. Daher ist die Renaturierung zu den "Tennisschlägern" und "Hanteln" erschwert und die Häufigkeit der offenen Ringstrukturen stark erhöht.

Die elektronenmikroskopischen Bilder des Viroids lassen sich mit den Modifikationsexperimenten gut korrelieren. Die bei den meisten Ringen beobachteten kurzen Fortsätze enthalten sehr wahrscheinlich das bisulfitresistente RNAase  $T_1$ -Fragment 24 (AUCCCCG), mit einem entsprechenden Gegenstrang (Abb. 33, Tab. 4).

## D. 10. Diskussion von Viroid-Modellen

Das Viroid-Modell von Riesner (19) beruht auf rein physikalisch-chemischen Messungen, ohne Berücksichtigung der Nukleotidzusammensetzung. Folgende, kurz erläuterte Messungen gingen in das Modell ein:

### 1. Ultrazentrifugation:

Die Sedimentationseigenschaften wiesen auf eine langgestreckte hydrodynamische Form mit einem Achsverhältnis von 1:20 hin.

### 2. Thermodynamische Messungen:

- a) Die extrem schmalen Schmelzkurven des Viroids ließen auf eine hohe Kooperativität des Schmelzprozesses schließen, die nur durch eine weitgehend helikale Anordnung erfüllt wird.
- b) Aus der gemessenen Reaktionsenthalpie des Schmelzprozesses konnte die Zahl der beteiligten Basenpaare (=52) für CPFV berechnet werden.
- c) Aus der Wellenlängenabhängigkeit  $\Delta A$  (260 nm) /  $\Delta A$  (280 nm) der Hyperchromizität des Schmelzvorganges wurde der Anteil von G:C und A:U Basenpaaren (72 % G:C, 28% A:U) im helikalen Bereich bestimmt.

### 3. Kinetische Messungen:

Durch die Temperatursprungkinetiken konnten drei Relaxationsprozesse unterschieden und getrennt untersucht werden:

- a) Ein zeitlich nicht auflösbarer Prozess, der dem "stacking- destacking"-Gleichgewicht der Einzelstrangbereiche zugeordnet werden konnte;
- b) ein schneller Relaxationsprozess, der der De- bzw. Renaturierung kurzer helikaler Bereiche entspricht und

- c) ein langsamer Relaxationsprozess, der die Konformationsänderungen des helikalen Bereichs mit vielen Basenpaaren widerspiegelt.

Die neueren Daten, die durch die Modifikationsversuche mit Bisulfit, sowie die Sequenzierung (H.Domdey, C.Lossow) erhalten wurden, führten zu einem verfeinerten Viroid-Modell, das unabhängig von dem physikalisch-chemischen Modell ausgearbeitet wurde. Folgende Beobachtungen wurden dabei berücksichtigt:

1. Bei der Durchsicht aller sequenzierten RNAase  $T_1$  - bzw. RNAase A - Fragmente von CPFV (Sequenzen: H. Domdey) findet man nur wenig völlig komplementäre Fragmente (vgl. Tab. 4)
2. CPFV weist eine überraschend hohe Reaktivität gegenüber Bisulfit auf. Nur ein ganz kurzer Abschnitt, dessen wahrscheinliche Struktur in Abb. 38 dargestellt ist, reagiert nach 96 stündiger Bisulfitbehandlung ( $27^{\circ}\text{C}$ ) praktisch nicht.
3. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von CPFV vor und nach Bisulfitbehandlung findet man oft Formen mit nicht ganz geöffnetem Ring und einem sehr kurzen stabilen doppelhelikalen Bereich (Abb. 36,37).

Das physikalisch-chemische Viroid-Modell von Riesner (19) und das verfeinerte Viroid-Modell sind in der Abb. 38 dargestellt.

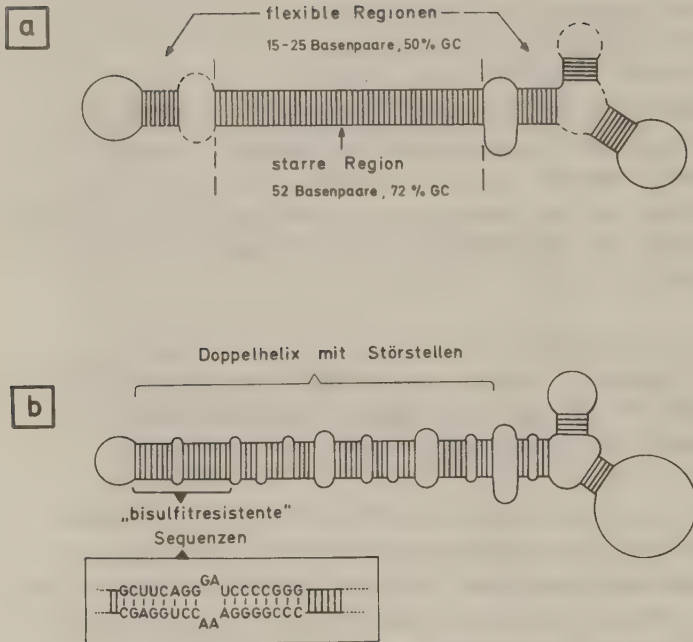


Abb. 38: Gegenüberstellung von zwei Viroid-Modellen:  
a) Viroid-Modell von Riesner (19), das auf physikalisch-chemischen Messungen beruht.  
b) Verfeinertes Viroid-Modell, das auf Grund der Sequenzierung und der Modifikationsexperimente mit Bisulfit gewonnen wurde.

Beim verfeinerten Viroid-Modell (Abb. 38 b) ist der starre Mittelteil der Hantel nicht mehr ideal basengepaart wie beim Modell von Riesner (Abb. 38 a), sondern von kürzeren einsträngigen Abschnitten durchsetzt. Dadurch ist die Helix destabilisiert und die hohe Reaktivität gegen Bisulfit erklärbar. Die geringe Zahl von komplementären Sequenzen spricht ebenfalls für ein nichtideales

helikales Mittelteil des Viroids.

Der stabilste Bereich dieser destabilisierten Helix, dessen wahrscheinliche Sequenz aus den Modifikationsversuchen mit Bisulfit hervorging (Tab. 4, Abb. 38 b), ist dabei in Übereinstimmung mit den elektronenmikroskopischen Daten (Abb. 36, 37) an einem Ende der Hantel lokalisiert, während sich am anderen Ende eine oder mehrere einzelsträngige Schleifen befinden.

#### D. 11. Infektiosität von CPFV nach Bisulfitbehandlung

Die Infektiosität des modifizierten Viroids wurde von Prof. H.L. Sänger (Justus Liebig-Universität, Gießen) geprüft. Die Proben die 24 Stunden bzw. 96 Stunden mit Bisulfit behandelt worden waren, zeigten keine Infektiosität mehr.

D. 12. Ableitung allgemeiner Beziehungen zwischen Brutto-  
zusammensetzung von Oligonukleotiden und ihrer  
Lage auf dem Fingerprint

D. 12.1. Allgemeine Vorbemerkungen

Diese Betrachtungen gelten für das angewandte zweidimensionale Trennverfahren:

1. Dimension: Hochspannungselektrophorese auf  
Zelluloseacetat in 7 M Harnstoff,  
Elektrodenpuffer 5% Essigsäure/Pyridin  
pH 3,5
2. Dimension: Homochromatographie mit einer 3%igen  
RNA-Lösung, die mit 50 mM KOH hydro-  
lysiert wurde. (siehe "Methoden", E.2.7.3).

In der 1. Dimension werden die Oligonukleotide gemäß ihrer Basenzusammensetzung getrennt. Bei dem gewählten pH sind die negativen Ladungen der einzelnen Nukleotide in folgender Reihenfolge abgestuft  $U > G > A > C$ , d.h. Cytidin läuft in der 1. Dimension am langsamsten, Uridin am schnellsten. Die komplexeren Oligonukleotide laufen entsprechend ihrer Zusammensetzung mehr oder weniger weit (92). Jeder Austausch eines Nukleotids mit geringerer negativen Ladung gegen eines mit größerer negativen Ladung führt, da die Kettenlänge gleich bleibt, zu einem Anwachsen der Wanderungsgeschwindigkeit. Dieser Effekt kann gut bei der Umwandlung von Cytidin in Uridin durch Bisulfit beobachtet werden (Abb. 31, 33).

In der 2. Dimension werden die Oligonukleotide entsprechend ihrer Kettenlänge getrennt (Abb. 31). Je länger ein Fragment ist, desto geringer ist seine Laufstrecke. Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Purin- bzw. Pyrimidingehalt der Oligonukleotide. Oligo-Purine laufen deutlich langsamer

als Oligo-Pyrimidine gleicher Kettenlänge.

#### D. 12.2. Schema für den Ribonuklease A - Fingerprint

Die Oligonukleotide des RNAase A - Fingerprints lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

Gruppe 1: Oligonukleotide, die auf Cytidin endigen.

Gruppe 2: Oligonukleotide, die auf Uridin endigen.

Die Oligonukleotide  $(A)_n C$ ,  $(G)_n C$  = Gruppe 1 bzw.  $(A)_n U$ ,  $(G)_n U$  = Gruppe 2 liegen auf den extremen Begrenzungslinien zweier sich durchdringender Flächen, in die sich alle anderen Oligonukleotide entsprechend ihrer Zusammensetzung auf sprossenartigen Linien anordnen lassen (Abb. 39).

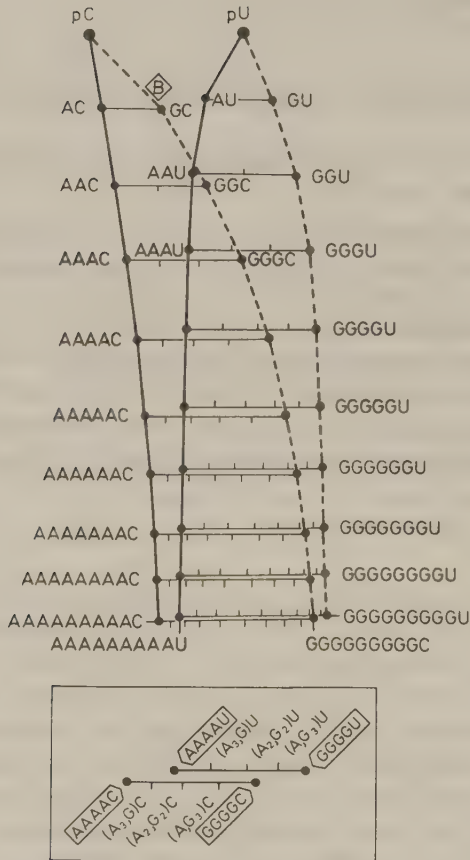


Abb. 39: Zusammenhang zwischen der Bruttozusammensetzung eines RNAase A - Fragmentes und seiner Lage auf dem Fingerprint. Oligonukleotide gleicher Kettenlänge liegen auf parallelen Linien gleicher Höhe. Die Lage eines beliebig zusammengesetzten Oligonukleotids einer Kettenlänge geht aus der Detailzeichnung hervor. Das Schema gilt für das verwendete Trennsystem:

1. Dimension: Hochspannungselektrophorese in 5% Essigsäure/Pyridin pH 3,5 (von links nach rechts)
2. Dimension: Homochromatographie (von unten nach oben)

Ein ähnliches Schema wurde von Fiers et.al. entwickelt (93).

Da die RNAase A - Fragmente gleicher Kettenlänge (n) stets den gleichen Purin-(n-1) bzw. Pyrimidingehalt (1) haben, laufen sie alle in der 2. Dimension auf gleicher Höhe. Genauere Analysen zeigten jedoch, daß die Gruppe der cytidinhaltigen Fragmente in der 2. Dimension etwas langsamer läuft als die Gruppe der uridinhaltigen Fragmente gleicher Kettenlänge.

Die horizontale Anordnung der Oligonukleotide erfolgt je nach ihrer Zusammensetzung zwischen den extremen Begrenzungslinien (Abb. 39, Detailzeichnung). Jeder Austausch eines Adenosins gegen ein Guanosin führt zu einer Verschiebung um eine Längeneinheit nach rechts. So gelangt man z.B. vom linken Extrempunkt AAAAC durch vierfachen A/G-Austausch schrittweise schließlich zum rechten Extrempunkt GGGGC. Die gleichen Überlegungen gelten natürlich auch für die Oligonukleotide der schneller wandernden Gruppe 2, die auf U endigen (AAAAU, GGGGU).

#### D. 12.3 Schema für den Ribonuklease T<sub>1</sub>-Fingerprint

Die Analyse des RNAase T<sub>1</sub>-Fingerprints ist dadurch erschwert, daß die Purin/Pyrimidin-Zusammensetzung von Fragmenten gleicher Kettenlänge unterschiedlich ist. Als Folge davon sind die Oligonukleotide gleicher Kettenlänge nicht wie beim RNAase A-Fingerprint eindimensional in einer horizontalen Linie angeordnet, sondern in Form von sich immer stärker überlappenden Dreiecken (Abb. 40).

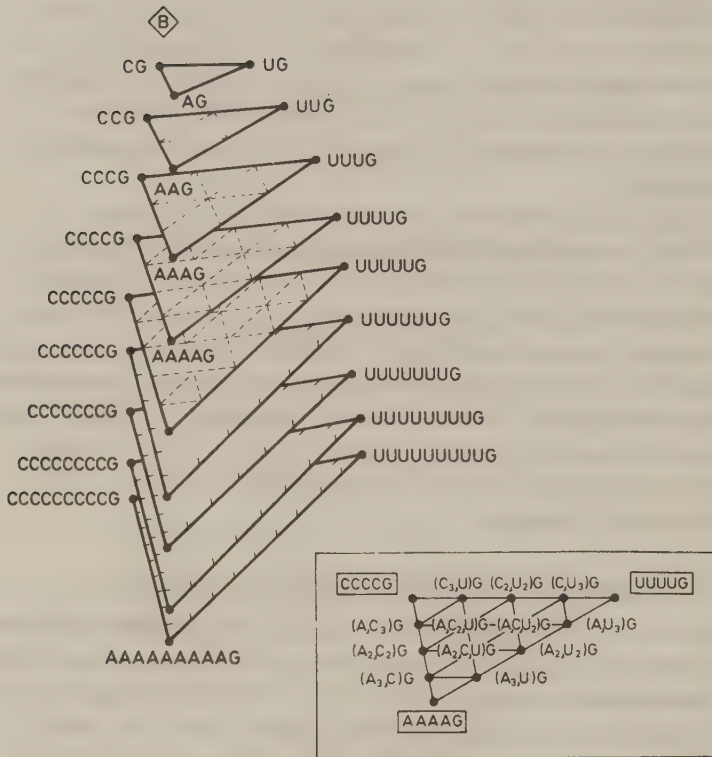


Abb. 40: Zusammenhang zwischen der Bruttozusammensetzung eines RNAase T<sub>1</sub>-Fragmentes und seiner Lage auf dem Fingerprint. Oligonukleotide gleicher Kettenlänge sind innerhalb dreieckiger Flächen angeordnet, die sich immer mehr überlappen. Die Lage eines beliebig zusammengesetzten Oligonukleotids innerhalb eines Dreiecks geht aus der Detailzeichnung hervor. Das Schema gilt für das verwendete Trennsystem:

1. Dimension: Hochspannungselektrophorese in 5% Essigsäure/Pyridin pH 3,5 (von links nach rechts)
2. Dimension: Homochromatographie (von unten nach oben)

Die Extrempunkte dieser Dreiecke werden von den Oligonukleotiden  $(C)_nG$ ,  $(U)_nG$  und  $(A)_nG$  gebildet. Alle anderen Oligonukleotide bilden ein regelmäßiges Gitter mit den Dreiecksseiten als Begrenzung (Abb. 40, Detailzeichnung).

Ausgehend von den Extrempunkten kann die Bruttozusammensetzung jedes Gitterpunktes (=Oligonukleotid) durch schrittweisen Austausch je eines Nukleosids abgeleitet werden. Vom linken oberen Extrempunkt (Oligonukleotid CCCC<sub>G</sub>) kommt man z.B. durch zweifachen C/U-Austausch, der mit je einer Verschiebung nach rechts verbunden ist, zu einem Oligonukleotid der Bruttozusammensetzung  $(C_2, U_2)G$ . Ein anschließender U/A-Austausch bewirkt eine Verschiebung um eine Einheit nach links unten und man erreicht das Oligonukleotid  $(A, C_2, U)G$ . Auf diese Weise ist es möglich von der Lage eines Oligonukleotids im Fingerprint auf seine Bruttozusammensetzung zu schließen. Da sich die einzelnen Dreiecke jedoch immer stärker überlappen sind eindeutige Aussagen in diesem Bereich nicht mehr möglich.

Schließlich muß noch einschränkend betont werden, daß der Einfluß der Sequenz bei Oligonukleotiden gleicher Bruttozusammensetzung in einigen Fällen nicht vernachlässigt werden darf, und deutliche Abweichungen von dem angegebenen Schema feststellbar waren. Insgesamt können diese Schemata jedoch große Dienste bei der Kontrolle von Oligonukleotidsequenzen leisten.

E. Experimenteller Teil

E. 1. Material und Geräte

E. 1.1. Materialien

| Material                                                                       | Bezugsquelle                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| a) <u>Enzyme:</u>                                                              |                                                                           |
| Ribonuklease T <sub>1</sub> aus <i>Aspergillus oryzae</i><br>(E.C. 3.1.4.8)    | Sankyo Co. Ltd.<br>Tokyo                                                  |
| Ribonuklease T <sub>2</sub> aus <i>Aspergillus oryzae</i><br>(E.C. 3.1.4.23)   |                                                                           |
| Schlangengiftphosphodiesterase<br>(E. C. 3.1.4.1)                              | Worthington Biochemical Corporation<br>P-L-Biochemicals Inc.<br>Milwaukee |
| Nuklease P <sub>1</sub> aus <i>Penicillium citrinum</i><br>(E.C. 3.1.4.x)      |                                                                           |
| Ribonuklease A aus Rinderpankreas<br>(E.C. 3.1.4.22)                           | Boehringer<br>Mannheim                                                    |
| alkalische Phosphatase aus <i>E.coli</i><br>(E.C. 3.1.3.1)                     |                                                                           |
| Hexokinase aus Hefe<br>(E.C. 2.7.1.1)                                          | von Dr. D Wildenauer<br>in diesem Labor isoliert (94, 95)                 |
| 3-Phosphoglyceratkinase aus Hefe<br>(E.C. 2.7.2.3)                             |                                                                           |
| Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel<br>(E.C. 1.2.1.12) | eigene Präparation.<br>siehe "Methoden"                                   |
| 5'-Polynukleotidkinase aus T4-infizierten <i>E.coli</i> -Zellen                |                                                                           |
| Methyltransferasen aus Rattenleber bzw. aus <i>E.coli</i>                      |                                                                           |

| Material                                                                                                                                                                                                      | Bezugsquelle                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| b) <u>Ribonukleinsäuren:</u><br>CPFV<br>("cucumber pale fruit viroid")                                                                                                                                        | von Prof.H.L. Sanger,<br>(Justus-Liebig-Uni-<br>versität, Gießen) iso-<br>liert und zur Verfü-<br>gung gestellt                                                      |
| $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ aus Kaninchenleber                                                                                                                                                               | in diesem Labor ge-<br>reinigt, siehe "Metho-<br>den"                                                                                                                |
| tRNA aus $\text{T}^-$ E.coli                                                                                                                                                                                  | Geschenk von Prof.Dr.<br>U.L. RajBhandary, M.I.T.                                                                                                                    |
| $[^3\text{H-CH}_3]$ - Thymidin-tRNA aus<br>E.coli                                                                                                                                                             | durch enzymatische<br>Methylierung von tRNA<br>aus $\text{T}^-$ E.coli mit<br>$[^3\text{H-CH}_3]$ - Ado-Met<br>als Methyldonor von<br>Dr.H.J. Gross darge-<br>stellt |
| tRNA aus E.coli                                                                                                                                                                                               | Boehringer, Mannheim                                                                                                                                                 |
| $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ aus E.coli                                                                                                                                                                       | in diesem Labor ge-<br>reinigt (81)                                                                                                                                  |
| c) <u>Nukleotide und Nukleoside:</u><br>pA, pC, pG, pU, Ap, Cp, Gp, Up<br>A, C, G, U, $\Psi$ , p $\Psi$ , I, ATP<br>$\text{m}^1\text{A}$ , $\text{m}^6\text{A}$ , $\text{m}^5\text{C}$ , $\text{m}^7\text{G}$ | Boehringer, Mannheim bzw.<br>Serva, Heidelberg                                                                                                                       |
| $\text{m}^2\text{G}$                                                                                                                                                                                          | Cyclo Chemicals, Los<br>Angeles                                                                                                                                      |
| T                                                                                                                                                                                                             | Geschenk von Dr. M.<br>Saneyoshi, Tokyo                                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                               | Calbiochem, San Diego                                                                                                                                                |

| Material                                                                                                                                                                                                             | Bezugsquelle                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PI                                                                                                                                                                                                                   | Synthese aus Inosin und Phenylphosphat mit gereinigter Nukleosid-5'-Phosphotransferase aus Karetten in diesem Labor (96) |
| d) <u>radioaktive Substanzen:</u><br>S-Adenosyl-L-Methionin<br>Methyl [ $^{14}\text{C}$ ]<br>0,34 mg / 2,5 ml<br>Spezifische Aktivität 58 Ci/Mol<br>[ $^{32}\text{P}$ ] - $\text{H}_3\text{PO}_4$ trägerfrei, 25 mCi | NEN-Chemicals,<br>Dreieichenheide                                                                                        |
| e) <u>Chromatographiezubehör:</u><br>DEAE- Zellulose für Säulenchromatographie, DE 23                                                                                                                                | Whatman Biochemicals Ltd.                                                                                                |
| Zellulose Fertigplatten für Dünnschichtchromatographie (20 x 20 cm) ohne Fluoreszenzindikator                                                                                                                        | Merck, Darmstadt                                                                                                         |
| Polygram Cell 300 DEAE-/HR-2/15-Platten für Homochromatographie (20 x 40 cm)                                                                                                                                         | Macherey-Nagel und Co, Düren                                                                                             |
| f) <u>Trägermaterialien für die Hochspannungselektrophorese</u><br>Zelluloseacetatstreifen (30 x 550 mm)                                                                                                             | Schleicher und Schüll GmbH, Dassel                                                                                       |
| DE 81 - Papier (570 x 460 mm)                                                                                                                                                                                        | Whatman Biochemicals Ltd.                                                                                                |

| Material                                       | Bezugsquelle |
|------------------------------------------------|--------------|
| g) Filme für die Autoradiographie              |              |
| Kodak RP Royal X-Omat<br>(RP/R-54) Röntgenfilm | Kodak        |

#### E. 1.2 Geräte

| Art                                      | Hersteller und Typ                                                                                 |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zentrifugen:                             | Ultrazentrifuge IEC B 60<br>bzw. IEC B 20<br>Heraeus Christ, Minifuge<br>Eppendorf Zentrifuge 3200 |
| UV-Spektrometer:                         | Bausch and Lomb, Spectronic 700                                                                    |
| Szintillationsspektrometer:              | Packard, TRI-CARB Modell: 3380<br>bzw. Modell: 3390                                                |
| Dünnschicht-Scanner:                     | Berthold, Wildbad                                                                                  |
| Dünnschicht-Scraper:                     | Desaga, Heidelberg                                                                                 |
| Hochspannungselektrophorese:             | Savant Instr. Inc., Hicksville,<br>New York, Modell 8036                                           |
| Gelelektrophorese:                       | E-C Apparatus Corp., Vertical Gel<br>Philadelphia, Pa.                                             |
| Fraktionssammler und<br>Registriergerät: | LKB Ultrorac 7000<br>LKB Uvicord II                                                                |
| Homogenisatoren:                         | Braun Mixer und Ultraturrax                                                                        |

## E. 2. Methoden

### E. 2.0. Reinigung von $\text{tRNA}_{\text{Val}}$ aus Kaninchenleber

Rohe tRNA wurde nach Rogg et al. (98) von K. Limburg und M. Raba in diesem Labor isoliert. Die Reinigung der valinakzeptierenden Hauptspezies  $\text{tRNA}_{\text{Val}}$  gelang E. Stephens durch mehrere Säulenchromatographien (Abb. 41).

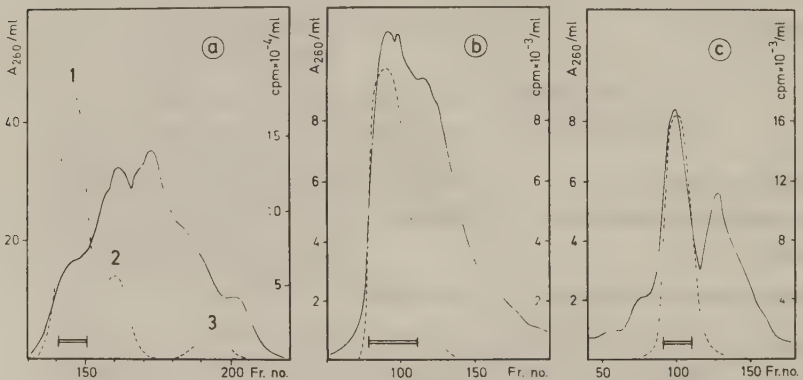


Abb. 41: Reinigung von  $\text{tRNA}_{\text{Val}}$  aus Kaninchenleber

———— = optische Dichte bei 260 nm

----- = Valin-Akzeptoraktivität ( $^3\text{H}$  cpm)

- a) DEAE Sephadex A 50-Chromatographie von roher tRNA aus Kaninchenleber
- b) Chromatographie von  $\text{tRNA}_{\text{Val}}$  (a) an benzoylierter DEAE-Zellulose bei pH 6,0
- c) Chromatographie von  $\text{tRNA}_{\text{Val}}$  (b) an benzoylierter DEAE-Zellulose bei pH 3,0 in 7 M Harnstoff

Nach der letzten Säulenchromatographie war die tRNA über 90% rein.

E. 2.1. "m<sup>7</sup>G - Spaltung" von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber  
(62, 63)

Durch milde Alkalibehandlung, gefolgt von einer Inkubation mit Anilin bei saurem pH läßt sich tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> spezifisch am m<sup>7</sup>G in zwei Fragmente spalten (Abb. 4). Durch Chromatographie über eine DEAE-Zellulose-Säule konnten die beiden "m<sup>7</sup>G-Fragmente" aus dem Reaktionsansatz isoliert werden. Die Trennung und weitere Reinigung erfolgte durch präparative Gelelektrophorese.

Spaltbedingungen:

1. 0,05 M NaOH pH 12  
20 min/25°C
2. 0,14 M Anilin/Essigsäure pH 4,5  
4 h/37°C

Reaktionsvolumen: 3 A<sub>260</sub>-Einheiten tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> in 50 µl  
(1.) bzw. 100 µl (2.)

E. 2.2. Analytische und präparative Diskelektrophorese (64)

Diskelektrophorese unter dissoziierenden Bedingungen (11%ige bzw. 16%ige Polyacrylamidgele in 7 M Harnstoff) wurden zur präparativen Trennung und Reinigung der "m<sup>7</sup>G-Fragmente" von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> angewandt (Abb. 4, 13, 14). Die Anfärbung der Banden erfolgte mit Toluidinblau bei präparativen Gelen, bzw. bei analytischen Gelen mit dem Farbstoff "stains all"

( = 1-äthyl-2 [3- (1-äthylnaphto (1,2d) thiazolin-2-yliden) -2-methylpropenyl] naphtho (1,2 d) thiazoliumbromid; Eastman Kodak Co.)

Zum Eluieren der angefärbten RNA wurden die Banden ausgeschnitten und 7 mal mit phenolhaltigem Puffer homogenisiert (Ultraturrax). Die unlöslichen Gelteilchen wurden jeweils durch Zentrifugation abgetrennt. Aus den vereinigten wässrigen Extrakten konnte die RNA durch Chromatographie über eine DEAE-Zellulose-Säule isoliert werden.

Um die Verluste bei mehrfachen Gelelektrophoresen gering zu halten, wurden die ausgeschnittenen Gelstreifen nicht extrahiert, sondern nach Homogenisation mit Sammelgellösung direkt auf das nächste Polyacrylamidgel aufpolymerisiert.

Extraktionspuffer: Zur Rückgewinnung von RNA aus Polyacrylamidgelen.

|            |      |                   |
|------------|------|-------------------|
| O,1 M NaAc | pH 5 | } phenolgesättigt |
| O,9 M NaCl |      |                   |

### E. 2.3. Herstellung von Methyltransferase-Rohextrakten aus E.coli bzw. aus Rattenleber

Die beiden Verfahren ähneln sich und sollen daher gemeinsam beschrieben werden. Alle Schritte der Enzympräparation wurden bei +4°C durchgeführt. Am Anfang stand die Homogenisation der Zellen bzw. des Gewebes mit einem geeigneten Aufschlußpuffer (Tab. 5). Die frisch entnommenen Rattenlebern wurden mit einem Mixer zerkleinert. Die E.coli-Bakterien wurden mit inaktiviertem  $Al_2O_3$  in einer Reibschale zerrieben. Zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wurden die Homogenate 3 Stunden bei 150 000 g zentrifugiert. Die im UZ-Überstand noch enthaltene endogene RNA ließ sich durch eine Filtration in 0,3 M NaCl über eine kleine DEAE-Zellulose-Säule entfernen (Tab. 8). Zur weiteren Anreicherung schloß sich bei der Enzympräparation aus Rattenleber eine Ammoniumsulfatfällung (75% Sättigung) an. Nach Abzentrifugation der Proteine wurden diese in wenig Puffer A (Tab. 5) gelöst. Diese Lösung bzw. das Eluat der DEAE-Zellulose-Säule bei der E.coli-Präparation wurde schließlich gegen einen stark glycerinhaltigen Puffer (Tab. 5) dialysiert. Die auf diese Weise erhaltenen rohen Enzymextrakte konnten bei -20°C über mehrere Wochen ohne merklichen Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

|                              | Rattenleber                                                                                            | E.coli                                                                                     |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aufschlußpuffer              | 0,25 M Saccharose<br>10 mM Tris/HCl pH 7,8<br>10 mM MgCl <sub>2</sub><br>1 mM Mercaptoäthanol<br>(MSH) | 40 mM Tris/HCl pH 7,5<br>10 mM MgCl <sub>2</sub><br>10 mM MSH<br>20 mM KCl<br>10% Glycerin |
| Rezept für<br>Homogenisation | 40 ml Aufschlußpuffer<br>pro 10 g Rattenleber                                                          | 50 ml Aufschlußpuffer<br>pro 10 g E.coli                                                   |
| Dialysepuffer                | 10 mM Tris/HCl pH 7,8<br>1 mM NaEDTA<br>1 mM MSH<br>50% Glycerin                                       |                                                                                            |
| Puffer A                     | entspricht dem Dialyse-<br>puffer, jedoch mit<br>25% Glycerin                                          | nicht erforderlich                                                                         |

Tab. 5: Puffer zur Herstellung von Methyltransferaseroh-  
extrakten aus Rattenleber bzw. E.coli (28, 99).

#### E. 2.4. Analytische Methylierung von tRNA (28, 100)

Das allgemeine Reaktionsschema kann der Abb. 42 entnommen  
werden.

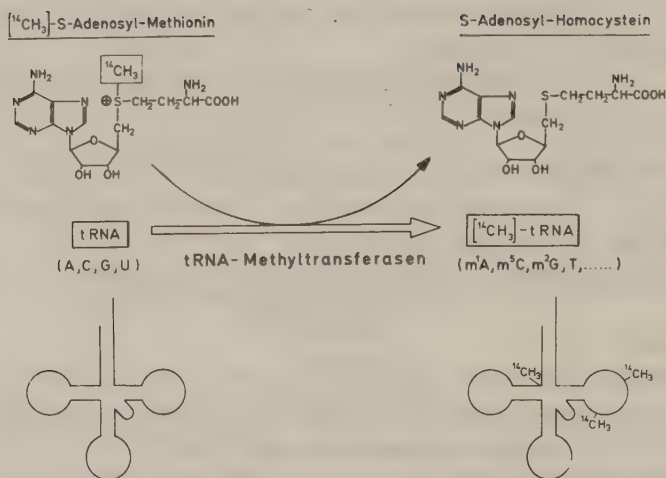


Abb. 42: Schema der enzymatischen Methylierung von tRNA mit radioaktivem  $[^{14}\text{CH}_3]$  - Ado-Met als Methyl-donor. Unerwünschte Nebenreaktionen sind die Methylierung von Proteinen und endogener tRNA des Enzymroh-extraktes.

Der analytische Methylierungsansatz diente dazu, den zeitlichen Verlauf und die Größe des Methyleinbaus in ein geeignetes tRNA-Substrat zu bestimmen. Um die Reaktion einfach verfolgen zu können, wurde radioaktiv markiertes  $[^{14}\text{CH}_3]$  -S-Adenosyl-Methionin ( $[^{14}\text{CH}_3]$ -Ado-Met) als Methyl-donor eingesetzt. Zu den gewählten Zeitpunkten wurden dem Reaktionsgemisch Aliquote entnommen und auf Filterscheibchen aufgetragen. Das methylierte polymere Material (tRNA, Proteine) wurde in einem 5%igen Trichloressigsäure-Bad (TCA) auf den Filtern ausgefällt, während das überschüssige radioaktive  $[^{14}\text{CH}_3]$  - Ado-Met in Lösung ging. Für ein gründ-

liches Auswaschen sorgten mehrere aufeinanderfolgende Bäder bei Raumtemperatur:

3 mal in 5% TCA

1 mal in Äther/Äthanol 1:1

1 mal in Äther

Die getrockneten Filter wurden in Zählfläschchen gesteckt mit Szintillationscocktail (Toluol/PPO) übergossen und im Szintillationszähler gemessen. Um die unerwünschten Nebenreaktionen, wie die spezifische und unspezifische Proteinmethylierung sowie die Methylierung noch vorhandener endogener tRNA zu erfassen und zu korrigieren, wurde jeweils ein Kontrollversuch ohne zugesetzte tRNA gemacht. Zur Stimulierung des Methyleinbaus und zur Variation der Methylierungsbedingungen enthielten die Ansätze entweder  $Mg^{++}$  oder das biogene Amin Cadaverin (Tab. 6).

| Komponenten                                                                                                                                                                                 | Konzentration                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| tRNA<br>[ <sup>14</sup> CH <sub>3</sub> ] - Ado-Met<br>(spez. Akt. 58 Ci/Mol)<br>Methyltransferaseroh-<br>extrakt.                                                                          | 0,76 µM    ≅    7,5 µg    /    330 µl<br>15    µM    ≅    2 µg    /    330 µl<br><br>10-15% des Gesamtvolumens |
| Tris / HCl pH 7,8<br>reduziertes Glutathion<br>MgCl <sub>2</sub><br>Cadaverin                                                                                                               | 0,1 M<br>10 mM<br>1 mM<br>10 - 30 mM    }    wahlweise                                                         |
| Gesamtvolumen des analytischen Ansatzes = 330 µl<br>Inkubation bei 37°C : 2,5 - 6 Stunden<br>Entnahme von Aliquoten: 6 mal je 50 µl oder<br>3 mal je 100 µl zu den<br>gewählten Zeitpunkten |                                                                                                                |

Tab. 6: Allgemeiner Methylierungsansatz für tRNA

Die Ergebnisse der analytischen Methylierung wurden graphisch dargestellt (Abb. 43) und waren Grundlage für die folgenden präparativen Methylierungsexperimente.

Radioaktivität im Aliquot  
(TCA-unlösliches Material)

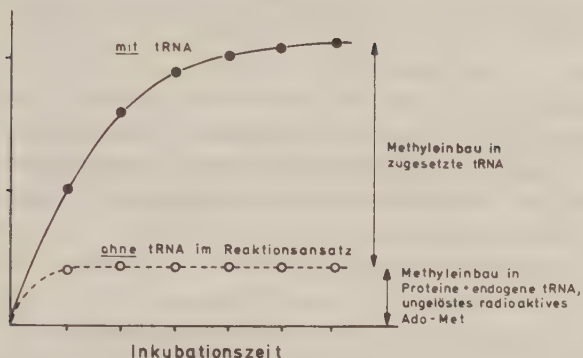


Abb. 43: Graphische Darstellung eines analytischen Methylierungsexperimentes (Reaktionskinetik).

E. 2.5. Präparative Methylierung und Isolierung der methylierten tRNA

Um genügend radioaktiv markierte methylierte tRNA für weitere Untersuchungen zu erhalten, mußte das Reaktionsvolumen des allgemeinen Methylierungsansatzes (Tab. 6) auf 3,5 bis 28 ml vergrößert werden. Nach Beendigung der Reaktion und Zugabe von nichtradioaktiver Träger-tRNA wurden die Proteine durch mehrfaches Ausschütteln mit wässrigem Phenol entfernt (4 mal). Das in der wässrigen Phase gelöste Phenol wurde ausgeäthert (3 mal) und die tRNA durch Säulenchromatographie über eine DEAE-Zellulose-Säule gereinigt und isoliert. Die eluierte tRNA wurde mit Äthanol gefällt, mehrmals gewaschen, getrocknet und in einem kleinen Volumen Wasser gelöst bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

E. 2.6. Enzymatische Methoden zur Bestimmung von Art und Lage der methylierten Nukleoside in tRNA

E. 2.6.1. Ribonuklease T<sub>2</sub>-Spaltung zur Nukleotidanalyse

Ribonuklease T<sub>2</sub> aus *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.1.4.23) ist eine Endonuklease und spaltet Ribonukleinsäuren zu den Mononukleotiden mit 3'-Phosphat. Das Enzym eignet sich daher sehr gut für Nukleotidanalysen. Als gutes Trennsystem für die entstehenden Nukleotidgemische erwies sich die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie mit den Laufmitteln A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> (Abb. 5, 18, 25, 27, 29).

E. 2.6.2. Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Alkalische Phosphatase aus *E. coli* (E.C. 3.1.3.1.) spaltet endständige 3'- oder 5'-Phosphate ab. Wenn als authentische Vergleichssubstanzen nur Nukleoside zur Verfügung standen, konnten die nach RNAase T<sub>2</sub>-Spaltung erhaltenen Nukleosid-3'-Phosphate durch Behandlung mit Phosphatase in die entsprechenden Nukleoside überführt und weiter chromatographisch untersucht und identifiziert werden (Abb. 19, 22, 28).

E. 2.6.3. Ribonuklease T<sub>1</sub>-Spaltung oder Ribonuklease A-Spaltung zur Eingrenzung der Lage methylierter Nukleoside

RNAase T<sub>1</sub> aus *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.1.4.8) und RNAase A aus Rinderpankreas (E.C. 3.1.4.22) sind Endonukleasen unterschiedlicher Spezifität:

RNAase T<sub>1</sub> spaltet RNA nur nach 3'-Guanosinphosphat.

RNAase A spaltet RNA nur nach dem 3'-Phosphat von Pyrimidinen.

Bei beiden Ribonukleasen entstehen intermediär zyklische 2', 3'-Phosphate als Zwischenprodukte. Von den beiden Enzymen wurde nur RNAase T<sub>1</sub> zur Spaltung methylierter tRNA verwendet. Die entstehenden Oligonukleotide wurden säulenchromatographisch getrennt (DEAE-Zellulose) und auf Radioaktivität (<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>-Einbau) untersucht (Abb. 21).

Durch Einsatz dieser Enzyme kann der Ort einer Methylierung auf bestimmte Fragmente eingegrenzt werden. Die Kenntnis der Gesamtsequenz sowie die Nukleotidanalyse legt die Methylierung auf bestimmte Nukleotide innerhalb der Fragmente fest.

E. 2.6.4. Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase zur Sequenzierung von RNA-Fragmenten bzw. zur Nukleotidanalyse

Schlängengiftphosphodiesterase aus *Crotalus adamanteus* (E.C. 3.1.4.1) ist eine Exonuklease, die RNA schrittweise vom freien 3'-OH-Ende her abbaut. Es entstehen dabei Mononukleotide mit 5'-Phosphat. Der schrittweise Abbaumechanismus erlaubt die Isolierung aufeinanderfolgender Zwischenpro-

| Enzym                           | Enzym-menge     | Reaktions-volumen in $\mu$ l | Puffer                    | Zeit/Temperatur |
|---------------------------------|-----------------|------------------------------|---------------------------|-----------------|
| RNAase T <sub>2</sub>           | 2 E             | 50                           | 0,005 M Kalium-Ac pH 4,7  | 5 h/37°C        |
| alkalische Phosphatase          | 1 $\mu$ g       | 50                           | 0,02 M TEAB pH 8,5        |                 |
| RNAase T <sub>I</sub>           | 2 E             | (10 <sup>*</sup> ) 100       | 0,02 M TEAB pH 8<br>oder: |                 |
| RNAase A                        | 2 E             | (10 <sup>*</sup> ) 100       | 0,02 M Tris/HCl pH 8      |                 |
| Schlängengiftphosphodiesterase: |                 |                              |                           |                 |
| -vollständige Spaltung          | 5 $\mu$ g       | 100                          | 0,02 M TEAB pH 8,5        | 0,5-2 h/37°C    |
| -Partialsplattung               | 0,2-2,5 $\mu$ g | 100                          |                           |                 |

Tab. 7: Spaltbedingungen für die verschiedenen Enzyme bezogen auf 1 A<sub>260</sub>-Einheit RNA (=50 $\mu$ g)

\* = nur bei präparativen Ansätzen mit 300 A<sub>260</sub>-Einheiten RNA

dukte und somit die Sequenzierung von Oligonukleotiden (Abb. 22). Läßt man die Reaktion bis zum völligen Abbau laufen, so erhält man 5'-Phosphat-Mononukleotide für die Nukleotidanalyse.

Die Spaltbedingungen für die verschiedenen Enzyme sind in Tab. 7 aufgelistet.

## E. 2.7. Chromatographische Trennmethoden

### E. 2.7.1. Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie mit DEAE-Zellulose (DE 23) spielte eine besondere Rolle bei der Isolierung und Reinigung von RNA (Isolierung der " $m^7G$ -Fragmente" von  $tRNA_{1}^{Val}$ , Entsalzung von tRNA-Fragmenten, Isolierung der methylierten tRNA aus den Reaktionsansätzen), bei der Abtrennung unerwünschter tRNA aus Enzympräparationen (Darstellung tRNA-freier Methyltransferaserohextrakte), bei der Auftrennung von tRNA-Fragmenten nach ihrer Ladung (Analyse der RNAase  $T_1$ -Fragmente methylierter  $tRNA_{1}^{Val}$ , Abb. 21) und bei der Darstellung von  $\gamma$ - $[^{32}P]$ -ATP (Trennung von ATP und Phosphat).

Da die Bindung zwischen DEAE-Zellulose (DE 23) und Polynukleotiden im wesentlichen auf ionischer Wechselwirkung beruht, nimmt die Bindungsstärke mit wachsender Länge der Polynukleotidkette (=wachsende Ladung) zu. Gebundene Polynukleotide lassen sich daher durch Anlegen eines Gradienten aus Kochsalz oder TEAB nacheinander entsprechend ihrer Kettenlänge von der Säule eluieren. tRNA bindet noch bei 0,3 M NaCl an DEAE-Zellulose. Bei dieser Kochsalzkonzentration sind die Bindungskräfte zu anderen, nicht so stark negativ geladenen Verbindungen sehr gering, so daß sich tRNA leicht aus komplizierten Stoffgemischen (z.B. von Proteinen) abtrennen läßt. Alle Trennungen wurden durch automatische Registrierung der UV-Absorption bei 256 nm verfolgt. Tab. 8 gibt einen Überblick über die Anwendungsbreite der Säulenchromatographie mit DEAE-Zellulose (DE 23).

| Anwendung                                                                                                                                              | Säulenmaße |        | Puffer zur Äquilibration<br>bzw. Waschpuffer | Elutionspuffer                                                                                       | Kommentar                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| $\phi$ (cm)                                                                                                                                            | h (cm)     | V (ml) |                                              |                                                                                                      |                                                                                      |
| Entsalzen von RNA-Fragmenten<br>z.B. 10 A <sub>260</sub> -Einheiten                                                                                    | 0,5        | 5      | I                                            | 2 M TEAB pH 8,5                                                                                      | —                                                                                    |
| Isolation von tRNA oder<br>tRNA-Fragmenten aus<br>Reaktionsgemischen (Methylierung, "mG-Spaltung")<br>z.B. 10 A <sub>260</sub> -Einheiten              | 0,5        | 5      | I                                            | 0,1 M NaAc pH 5/<br>0,3 M NaCl<br>oder:<br>2 M TEAB pH 8,5                                           | {<br>Anschließend<br>Äthanol-fällung<br>erforderlich                                 |
| z.B. 100 A <sub>260</sub> -Einheiten                                                                                                                   | I          | 12     | IO                                           |                                                                                                      |                                                                                      |
| Abtrennung von endogener<br>tRNA aus Methyltransferase-<br>präparationen<br>z.B. 50 ml UZ-Überstand                                                    | 2          | 6,5    | 20                                           | Aufschlußpuffer<br>mit 0,3 M NaCl<br>entfällt                                                        | Die durch-<br>laufende<br>Lösung ist<br>TENA-frei                                    |
| Trennung von tRNA-Fragmenten<br>nach Kettenlänge (RNAase T <sub>1</sub> -<br>Fragmente von tRNA <sub>I</sub> )<br>z.B. 300 A <sub>260</sub> -Einheiten | 0,6        | 140    | 40                                           | Gradient:<br>0-0,4 M NaCl in<br>7 M Harnstoff<br>0,02 M Tris/HCl<br>pH 7,5, Gesamt-<br>volumen 2,4 l | Harnstoff<br>verringert<br>Wechselwir-<br>kungen<br>zwischen den<br>Fragmenten (IOI) |
| Trennung $\gamma$ -ATP und Phos-<br>phat ( $\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]-ATP)<br>z.B. 0,15 $\mu$ mol ATP                                                | 0,5        | 10     | 2                                            | Gradient:<br>0,01 - 1 M TEAB<br>pH 8, Gesamt-<br>volumen 150 ml                                      | —                                                                                    |

Tab. 8: Anwendungsbeispiele der Säulenchromatographie mit DEAE-Zellulose (DE 23)

### E. 2.7.2. Dünnschichtchromatographie

Die eindimensionale bzw. zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf Zelluloseplatten in verschiedenen Laufmittelsystemen (Tab. 9) diente zur Trennung und Identifikation von Nukleotiden bzw. Nukleosiden. Gleiches Laufverhalten von unbekannter Substanz und authentischem Material in verschiedenen Laufmitteln galt als Hinweis auf Identität. Die aufgetrennten nicht radioaktiv markierten Nukleotide bzw. Nukleoside wurden durch UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Zur Sichtbarmachung radioaktiver Substanzen auf der DC-Platte standen drei Verfahren zur Verfügung:

1. Autoradiographie
2. Einsatz des Dünnschicht-Scanners, dessen schmales Zählfenster die Dünnschichtplatte kontinuierlich nach Radioaktivität abtastet und die Radioaktivitätsverteilung mit einem gekoppelten Schreiber aufzeichnet.
3. Einsatz des Dünnschicht-Scrapers (97). Mit seiner Hilfe läßt sich die Zellulose in schmalen Streifen von der DC-Platte abschaben. Nach Zugabe von Szintillationscocktail zu der abgeschabten Zellulose kann die Aktivität jedes Streifens im Szintillationszähler gemessen werden. Da Nukleotide bzw. Nukleoside bei Verwendung von Toluol/PPO als Szintillator an die Zellulose gebunden bleiben, lassen sie sich nach Abfiltration und gründliches Waschen der Zellulosepartikel (Toluol, Äthanol) durch Elution mit 0,05 M TEAB zurückgewinnen.

Von allen drei Methoden ist die Methode 2 die mit der geringsten Empfindlichkeit (schlechte Zählausbeute der Geiger-Müller-Zählkammer).

| Bezeichnung    | Zusammensetzung                                                                    | Verwendung                         |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| A <sub>1</sub> | Isobuttersäure / NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O pH 4,3<br>577 : 38 : 385        | 1.Dimension                        |
| A <sub>2</sub> | t-Butanol / HCl <sub>Konz.</sub> / H <sub>2</sub> O<br>7 : 1,5 : 1,5               | 2.Dimension<br>Nukleotide<br>(102) |
| B              | Methanol / H <sub>2</sub> O<br>75 : 25                                             | Nukleoside                         |
| C              | n-Butanol / H <sub>2</sub> O<br>86 : 14                                            | Nukleoside                         |
| D              | Isobuttersäure / NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O pH 3,7<br>66 : 1 : 33           | Nukleoside<br>Nukleotide           |
| E              | n-Propanol / NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O<br>55 : 10 : 35                     | Nukleoside<br>Nukleotide           |
| F              | Isopropanol / NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O, 7 : 1 : 2                         | Nukleoside                         |
| G              | 100 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer<br>pH 6,8<br>60 g Ammoniumsulfat<br>2 ml n-Propanol | Nukleotide                         |

Tab. 9: Laufmittelsysteme für die Dünnschichtchromatographie  
NH<sub>3</sub> = 15 M (28%) Ammoniaklösung

### E. 2.7.3. Homochromatographie (103, 104)

Die Homochromatographie ist eine Verdrängungschromatographie bei der die unterschiedliche Affinität von RNA-Fragmenten verschiedener Kettenlänge zu den DEAE-Gruppen der Plattenbeschichtung (Dünnschichtplatten) ausgenutzt wird. Hierbei konkurrieren verschieden lange Oligonukleotide des Laufmittels mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden der zu trennenden Probe um Bindungsstellen an der DEAE-Zellulose.

Kürzere Oligonukleotide werden leichter verdrängt als längere. Das Ergebnis ist eine Auftrennung der radioaktiven Oligonukleotide nach ihrer Ladung bzw. Kettenlänge (Abb. 39). Durch Variation der Kettenlänge der Oligonukleotide im Laufmittel läßt sich die Trennung stark beeinflussen. Die Darstellung des Laufmittels für die Homochromatographie erfolgt durch begrenzte Hydrolyse von roher RNA aus Hefe mit einer definierten Menge an KOH (105, 106). Je nach KOH-Menge erhält man längere oder kürzere RNA-Bruchstücke im Laufmittel (Tab. 10).

|                                                |                                                                            |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 3% RNA (Na-Salz)<br>7 M Harnstoff<br>50 mM KOH | Hydrolyse: 20 h/65°C<br>danach<br>Stabilisation durch Eisessig<br>(pH 4,7) |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|

Tab. 10: Darstellung und Zusammensetzung einer Homochromatographielösung.

Die Homochromatographie wurde im Ofen bei 65°C durchgeführt.

#### E. 2.8. Darstellung von $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (107)

Die Darstellung beruht auf einer enzymatischen Austauschreaktion zwischen radioaktiv markierter [<sup>32</sup>P]-Phosphorsäure und nichtradioaktivem ATP (Tab. 11). Durch Verwendung von trägerfreier [<sup>32</sup>P]-Phosphorsäure konnte eine sehr hohe spezifische Aktivität erzielt werden. Nichtumgesetztes Phosphat wurde durch Säulenchromatographie vom radioaktiv markierten ATP abgetrennt (vgl. Tab. 8). Beim Einsatz von 25 mCi [<sup>32</sup>P]-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und 0,15 µMol ATP erhielt man ein  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP mit einer spezifischen Aktivität von 70 Ci/mM.

|                                                                                    |            |                            |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------------------|
| H <sub>2</sub> O                                                                   | 200 µl     |                            |
| 1 M Tris/HCl pH 8                                                                  | 17 µl      |                            |
| 0,1 M MgCl <sub>2</sub>                                                            | 21 µl      |                            |
| 40 mM reduziertes Glutathion                                                       | 17 µl      |                            |
| 10 mM 3-Phosphoglycerinsäure                                                       | 12 µl      |                            |
| 10 mM ATP                                                                          | 15 µl      | ≅ 0,15 µMol                |
| [ <sup>32</sup> P]-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 25 mCi                         | trägerfrei |                            |
| 3-Phosphoglyceratkinase/<br>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-<br>dehydrogenase (6 mg/ml) | 6 µl       |                            |
| Reaktionsvolumen:                                                                  | 285 µl     | Inkubation:<br>45 min/26°C |

Tab. 11: Vorschrift für die Austauschreaktion zur Darstellung von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP

E. 2.9. Spaltung von RNA mit Ribonuklease T<sub>1</sub> bzw. Ribonuklease A, Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase und 5'-[<sup>32</sup>P]-Phosphorylierung der Oligonukleotide mit 5'-Polynukleotidkinase aus T4 - Phagen-infizierten E.coli

Ein Nachteil der "klassischen" Sequenzierungstechnik (11, 12) ist ihr großer Materialbedarf. Stehen nur geringe Mengen an RNA zur Verfügung, so muß zu den wesentlich empfindlicheren radioaktiven Methoden übergegangen werden. Kernstück einer von Sanger entwickelten Technik (66, 68) ist die in vitro-Phosphorylierung von Oligonukleotiden mit 5'-Polynukleotidkinase (94, 95). 5'-Polynukleotidkinase aus T4 -infizierten E.coli überträgt die  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP auf das freie 5'-Hydroxylende von Oligonukleotiden. Verwendet man  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP so erhält man radioaktiv markierte RNA-Fragmente, die elektrophoretisch oder chromatographisch (Homochromatographie) trennbar sind. Die Fragmentierung der RNA kann durch

spezifische Ribonukleasen wie z.B. RNAase T<sub>1</sub> (guanosinspezifisch) oder RNAase A (pyrimidinspezifisch) erfolgen. Für eine spezifische Abspaltung 3'-terminaler Phosphatgruppen sorgt die daran anschließende Behandlung mit alkalischer Phosphatase. Die genaue Vorschrift zur Fragmentierung von RNA und in vitro - Phosphorylierung der Oligonukleotide ist in Tab. 12 angegeben.

a. Enzymatische Fragmentierung von RNA:

|                                | RNAase A                        | RNAase T <sub>I</sub>           |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| RNA                            | 0,1 A <sub>260</sub> -Einheiten | 0,1 A <sub>260</sub> -Einheiten |
| H <sub>2</sub> O               | 15 µl                           | 15 µl                           |
| 1 M Tris HCl pH 8              | 1 µl                            | 1 µl                            |
| RNAase T <sub>I</sub> (1 E µl) | -                               | 0,4 µl                          |
| RNAase A (0,5 mg/ml)           | 0,4 µl                          | -                               |

Inkubation: 3 h/37°C

alkalische Phosphatase (0,42 mg/ml) je 0,2 µl

Inkubation: 2 h/37°C

(\*) 40 mM Nitrilotriessigsäure pH 7,2 je 3 µl

Inkubation: 20 min/RT, dann 2 min/100°C, dann 0°C; Aufbewahrung: -20°C.



b. In-vitro-Phosphorylierung von RNA-Fragmenten:

|                                                    |                                          |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| RNAase A-bzw. RNAase T <sub>I</sub> -Hydrolysat    | 5 µl = 0,025 A <sub>260</sub> -Einheiten |
| γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP (0,3 nMol/µl, 70 Ci/nMol) | 10 µl                                    |
| 0,2 M MgCl <sub>2</sub>                            | 1 µl                                     |
| 0,3 M Mercaptoäthanol                              | 1 µl                                     |
| 5'-Polynukleotidkinase (1 E/µl)                    | 4 µl                                     |

Inkubation: 30 min/37°C

(\*\*\*) 10 mM Glucose 4 µl  
Hexokinase (0,1 µg/µl) 1 µl

Inkubation: 5 min/37°C

5 mM ATP 1 µl

Inkubation: 10 min/37°C

5 mM ATP 1 µl

Inkubation: 10 min/37°C, dann 2 min/100°C, dann 0°C; Aufbewahrung: -20°C.

Tab. 12: Vorschrift zur enzymatischen Fragmentierung von RNA (a) und in vitro-Phosphorylierung der entstehenden Oligonukleotide (b) für die Fingerpruntechnik.

- (\*) Durch die Behandlung mit Nitrilotriessigsäure und das kurzzeitige Erhitzen auf 100°C wird die alkalische Phosphatase inaktiviert.
- (\*\*\*) Um überschüssiges γ-[<sup>32</sup>P]-ATP zu entfernen, wird mit Glucose und Hexokinase Glucose-6-[<sup>32</sup>P]-Phosphat gebildet. Die zweimalige Zugabe von nicht radioaktiv markiertem ATP dient der Vervollständigung der Reaktion (Isotopenverdünnung).

E. 2.10. Zweidimensionale Auftrennung von radioaktiv markierten RNA-Fragmenten : "Fingerprint"

Die radioaktiv markierten RNAase T<sub>1</sub>- bzw. RNAase A-Fragmente können durch Hochspannungselektrophorese (Abb. 6, 7) bzw. durch Kombination von Hochspannungselektrophorese (HVE) und Homochromatographie (Homo) zweidimensional getrennt werden (Abb. 31, 33). Die erste Dimension besteht in beiden Fällen aus einer Hochspannungselektrophorese mit einem Zellulose-acetatstreifen als Träger. Für die Trennung in der zweiten Dimension werden die Fragmente entweder auf DEAE-Papier oder auf DEAE-Zellulose-Dünnschichtplatten übertragen. Das DEAE-Papier ist der Träger für eine zweite Hochspannungselektrophorese. Die DEAE-Zellulose-Dünnschichtplatten werden mit Homochromatographielösung bei 65°C entwickelt.

Das Auflösungsvermögen der beiden Trennverfahren ist unterschiedlich. Während durch kombinierte Hochspannungselektrophoresen kürzere Fragmente sehr gut getrennt werden, zeigen sich Schwächen bei der Auflösung längerer Oligonukleotide. Die Kombination von Hochspannungselektrophorese und Homochromatographie ergänzt das erste Verfahren durch bessere Trennung der längeren Oligonukleotide. Ein Nachteil der Homochromatographie ist der, daß die radioaktiven Fragmente nur zusammen mit einer großen Menge nichtradioaktiver Oligonukleotide (Homochromatographielösung!) von der DC-Platte isoliert werden können. Einen Überblick über die beiden Trennmethode gibt Tab. 13.

|             | Methode I (65-68)                                                                                        | Methode II (103-106)                                                         |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1.Dimension | Hochspannungselektrophorese auf Zelluloseacetatstreifen in 5% Essigsäure/Pyridin pH 3,5 in 7 M Harnstoff |                                                                              |
| 2.Dimension | Hochspannungselektrophorese auf DEAE-Papier (DE 81) in 7 % Ameisensäure                                  | Homochromatographie auf DEAE-Zellulose-Platten mit Homochromatographielösung |
|             | Abb. 6, 7                                                                                                | Abb. 31, 33                                                                  |

Tab. 13: Zweidimensionale Trennmethode für die radioaktive Fingerprinttechnik

E. 2.11. Vollständiger bzw. partieller Abbau von 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten Oligonukleotiden mit Schlangengiftphosphodiesterase oder Nuklease P<sub>1</sub>

Nuklease P<sub>1</sub> (E.C.3.1.4x) aus *Penicillium citrinum* ist eine weitgehend unspezifische Endonuklease, die Oligonukleotide (DNA und RNA) statistisch angreift und spaltet. Es entstehen dabei verschieden lange Oligonukleotide mit 5'-Phosphat. Zusammen mit der bereits erwähnten Schlangengiftphosphodiesterase (vgl.

E.2.6.4), die Oligonukleotide schrittweise vom 3'-OH-Ende her abbaut, kann dieses Enzym zur kontrollierten partiellen Spaltung von radioaktiven Oligonukleotiden dienen. Durch geschickte Wahl der Reaktionszeiten und/oder der Enzymkonzentration erhält man alle nur möglichen Abbauprodukte (Tab.14). Verlängert man die Reaktionszeit, so werden die Fragmente bis zu den 5'-Phosphat-Mononukleotiden gespalten. Wegen des radioaktiven 5'-Phosphates der Oligonukleotide ist es einfach, durch dünnschichtchromatographische Nukleotidanalyse das 5'-ständige Nukleotid zu identifizieren ("Endgruppenbestimmung"). Für die chromatographische Trennung eignen sich

am besten die Laufmittel A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> (Tab. 9).

Für eine Endgruppenbestimmung reichen etwa 1000-5000 cpm radioaktives Oligonukleotid aus (Čerenkov-Strahlung). Zur Analyse der partiellen Abbauprodukte sollten je nach Kettenlänge 10 000 - 100 000 cpm eingesetzt werden, um lange Expositionszeiten bei der Autoradiographie zu vermeiden.

| Enzym                                  | Reaktionsvolumen | Puffer                                                       | Enzymmenge        | Zeit                                        | Temperatur |
|----------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------|------------|
| <u>Schlangengiftphosphodiesterase:</u> |                  |                                                              |                   |                                             |            |
| - vollständige Spaltung                | 30 µl            | 0,05 M Tris/HCl<br>pH 8,6 /<br>5 mM Kaliumphosphat<br>pH 8,6 | 10 µg             | 3 h                                         | 37°C       |
| - Partialspaltung                      | 150 µl           |                                                              | 7,5 µg<br>+2,5 µg | { 0,2, 5, 10,<br>20, 30 min<br>60, 70 min } | RT<br>37°C |
| <u>Nuklease P<sub>I</sub>:</u>         |                  |                                                              |                   |                                             |            |
| - vollständige Spaltung                | 10 µl            | 50 mM NH <sub>4</sub> Ac<br>pH 5,3                           | 50 ng             | 30 min                                      | 37°C       |
| - Partialspaltung                      | 10 µl            |                                                              | 50 ng             | 0,5, 10 min                                 | RT         |

Tab. 14: Spaltbedingungen für den vollständigen bzw. partiellen Abbau von 5'-[<sup>32</sup>p]-markierten Oligonukleotiden mittels Schlangengiftphosphodiesterase bzw. Nuklease P<sub>I</sub>. Die Angaben beziehen sich auf 1 A<sub>260</sub>- Einheit RNA.

E. 2.12. Auftrennung der partiellen Abbauprodukte und  
Sequenzermittlung

Da die radioaktiv markierten Oligonukleotide nur eine  $[^{32}\text{P}]$ -Phosphatgruppe am 5'-Ende tragen, läßt sich nur das 5'-endständige Nukleotid direkt identifizieren (Endgruppenbestimmung). Alle anderen Nukleotide können nur indirekt, durch das chromatographische bzw. elektrophoretische Laufverhalten der verschiedenen Abbauprodukte eines Oligonukleotids charakterisiert werden. Hierzu trennt man das durch kontrollierte Partialsplaltung erhaltene Oligonukleotidgemisch entweder eindimensional durch Hochspannungselektrophorese (HVE) oder zweidimensional durch Kombination von HVE und Homochromatographie auf. Das zweite Verfahren entspricht der bereits beschriebenen Fingerprinttechnik (Tab. 13, Methode II). Das erste Verfahren besteht aus einer eindimensionalen Hochspannungselektrophorese auf DEAE-Papier. Die Puffer hierfür können entweder 7% Ameisensäure pH 1,7 oder 5% Essigsäure/Pyridin pH 3,5 sein. Die Sequenz eines Oligonukleotids ergibt sich beim eindimensionalen Verfahren aus dem berechneten "M"-Wert ("migration value"; 65). Die Berechnung der "M"-Werte erfolgt nach der Formel  $M = x/y$ , wobei y die Laufstrecke eines Oligonukleotids und x der Abstand zu seinem ersten Abbauprodukt ist (Abb. 8, 9).

Der empirische Zusammenhang von "M"-Wert und abgespaltenem Nukleotid geht aus Tab. 15 hervor (67).

| Nukleotid | "M"-Wert bei pH 3,5<br>(5% Essigsäure-Pyridin) | "M"-Wert bei pH 1,7<br>(7% Ameisensäure) |
|-----------|------------------------------------------------|------------------------------------------|
| pC        | 0,6 - 1,2                                      | 0,05 - 0,3                               |
| pA        | 2,1 - 2,9                                      | 0,4 - 1,1                                |
| pU        | 1,7 - 1,9                                      | 1,5 - 2,5                                |
| pG        | 2,6 - 4,4                                      | 1,2 - 3,1                                |

Tab. 15: Zusammenhang zwischen den berechneten "M"-Werten und dem abgespaltenen Nukleotid nach G.G. Brownlee (67). Sequenzermittlung mittels "M"-Werte siehe Abb. 8, 9.

Die Sequenzierung mittels der eindimensionalen Hochspannungselektrophorese ist auf kürzere Fragmente mit einer Kettenlänge von maximal 5-7 Nukleotiden beschränkt (vgl. Abb. 8, 9). Außerdem ist die Zuordnung von "M"-Wert und abgespaltenem Nukleotid oft nicht ganz eindeutig.

Wesentlich leistungsfähiger, vor allem bei längeren Fragmenten ist die zweidimensionale Technik. Aus einem zweidimensionalen Homochromatogramm (1. Dimension: HVE, 2. Dimension: Homochromatographie) lassen sich mehr Informationen gewinnen. Die Abstände zwischen zwei Oligonukleotiden in Laufrichtung der Homochromatographie zeigen an, ob ein Purin (großer Abstand) oder Pyrimidin (kleiner Abstand) abgespalten wurde. Die Richtung des "Abspaltungsvektors" (= Verbindungslinie zwischen zwei aufeinanderfolgenden Oligonukleotiden) ist von der Natur des abgespaltenen Nukleotids abhängig. Die empirischen "Vektorfelder" für die pA-, pC-, pG- und pU-Abspaltungen sind in Abb. 44 dargestellt.

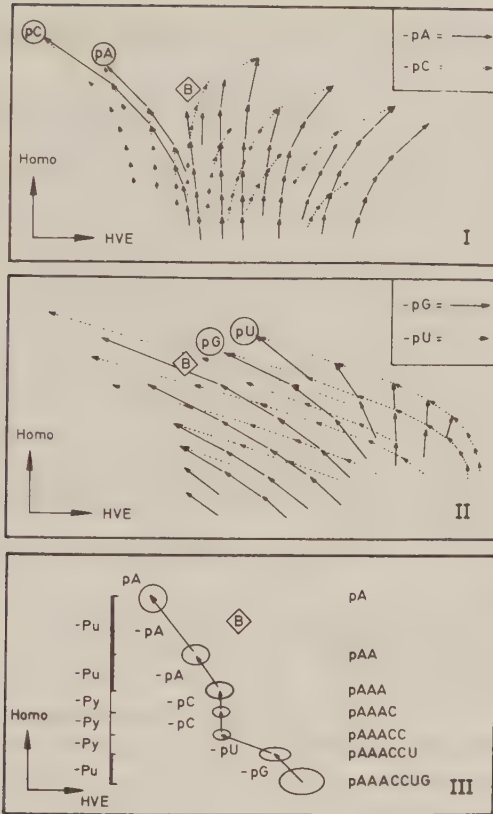


Abb. 44: Sequenzermittlung mittels zweidimensionaler HVE / Homochromatographie (1.Dimension: HVE, 2.Dimension: Homo) von 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten Oligonukleotiden nach kontrollierter partieller Spaltung mit Nuklease P<sub>1</sub> bzw. Schlangengiftphosphodiesterase.

- I. Vektorfeld für die pA- bzw. pC-Abspaltungen
- II. Vektorfeld für die pG- bzw. pU-Abspaltungen
- III. Beispiel für eine Sequenzanalyse mittels Abspaltungsvektoren nach zweidimensionaler Auftrennung der verschieden langen Abbauprodukte des Oligonukleotids pAAACCUG, (vgl. Abb. 34)

Pu = Purin, Py = Pyrimidin.

Die Schemata gelten für eine Laufstrecke von 8 cm für  $\Diamond$  (= "Xylene Cyanol FF") in der ersten (HVE), und 12 cm in der zweiten Dimension (Homo).

### E. 2.13. Modifikation von RNA mit Bisulfit (55-61)

Durch reversible Addition von Bisulfit an die 5,6-Doppelbindung von Cytidin wird dieses Nukleosid desaminiert und irreversibel in Uridin überführt (Abb. 30). Mit Hilfe der Bisulfitreaktion besteht die Möglichkeit einer spezifischen Umwandlung von Cytidin in Uridin. Die Modifikation ist dabei stark von der Sekundärstruktur der RNA abhängig. Cytidin in einzelsträngigen Bereichen reagiert bevorzugt, während Cytidin in basengepaarten Abschnitten nur sehr langsam oder nicht reagiert. Zur Umsetzung von CPFV-RNA mit Bisulfit wurde die von Goddard und Maden beschriebene Vorschrift (61) übernommen, bei der nach Umsetzung der RNA mit Bisulfit die Desaminierung und die Wiederabspaltung des Bisulfits durch eine Reihe von Dialysen gegen Puffer unterschiedlichen pH-Wertes erfolgt (Tab. 16).

#### Reaktionsansatz:

CPFV-RNA: 0,6 A<sub>260</sub>-Einheiten in 500 µl  
 3 M NaHSO<sub>3</sub> pH 5,9 mit bzw. ohne  
 20 mM MgCl<sub>2</sub>

Inkubation: 24 h, 96 h / 25°C  
 26 h / 5°C

#### Dialysen gegen:

- |                         |   |           |
|-------------------------|---|-----------|
| 1. 0,01 M NaCl          | } | RT        |
| 0,01 M Tris/HCl pH 7,5  |   |           |
| 2. 0,1 M Tris/HCl pH 9  |   | 10 h/35°C |
| 3. 0,05 M Tris/HCl pH 7 |   | RT        |
| 4. H <sub>2</sub> O     |   | RT        |

Tabelle 16: Vorschrift für die Modifikation von RNA mit Bisulfit

F.        Zusammenfassung

F. 1.    Zusammenfassung Teil 1: tRNA

1. Die Nukleotidsequenz von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Kaninchenleber ist identisch mit der von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> aus Maus-Myelomzellen (43, 44).
2. Das Anticodon IAC dieser tRNA erkennt im Ribosomenbindungstest alle vier Valin-Codons (Tab.1) mit einer bemerkenswerten Bevorzugung von GUG (mit Prof. S. Nishimura, Tokyo). Dies steht im Widerspruch zur Wobble-Hypothese von Crick (47). Der Valin-Code ist somit zu einem zwei-Buchstaben-Code degeneriert, bei dem das dritte Nukleotid nur dazu zu dienen scheint, unerwünschte Rasterverschiebungen zu verhindern.
3. Der "TΨC"-Stamm in tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> ist gegenüber allen anderen bisher bekannten tRNAs um ein A:U-Basenpaar verlängert (vgl. Abb. 3), gleichzeitig ist die "TΨC"-Schleife dadurch auf 5 Nukleotide verkürzt:
  - a) Das durch Spaltung am m<sup>7</sup>G erhaltene 3'-Fragment von tRNA<sub>1</sub><sup>Val</sup> weist ein zusätzliches A:U-Basenpaar (Abb. 15) auf, wie physikalisch-chemische Messungen zeigten (mit Prof. D. Riesner, Hannover).
  - b) Die stark eingeschränkte Methylierbarkeit von U<sub>54</sub>, sowie die unterschiedlichen Einflüsse von Mg<sup>++</sup> bzw. Cadaverin auf die in vitro - Methylierung im Vergleich zu tRNA aus T<sup>-</sup> E.coli weisen auf das Vorliegen eines U<sub>54</sub>:A<sub>60</sub>-Basenpaares hin (Abb. 23).
4. Die Biosynthese von T<sub>54</sub> bzw. Tm<sub>54</sub> bei tRNA ist in Rattenleber möglicherweise nicht vom Methyl donor S-Adenosyl-Methionin (Ado-Met) abhängig, da alle Versuche scheitern, ein solches Enzym mit Ado-Met als Methyl donor in Rattenleber nachzuweisen.

F. 2. Zusammenfassung Teil 2: Viroid-Struktur (CPFV)

1. CPFV ("cucumber pale fruit viroid") wurde unter verschiedenen Bedingungen mit Bisulfit umgesetzt. Bisulfit wandelt spezifisch nichtbasengepaartes Cytidin in Uridin um.
2. Die modifizierte CPFV-RNA wurde mit Ribonuklease T<sub>1</sub> bzw. Ribonuklease A gespalten und die in vitro mit  $\gamma$ - [<sup>32</sup>P]-ATP und 5'-Polynukleotidkinase markierten Oligonukleotide zweidimensional aufgetrennt ("Fingerprints", Abb. 31, 33).
3. Die Viroid-RNA zeigte gegenüber Bisulfit eine überraschend hohe Reaktivität, die nicht vereinbar ist mit dem physikalisch-chemischen Viroid-Modell von Riesner (19). Die einzelnen Viroid-Fragmente wurden bezüglich ihrer Reaktivität gegen Bisulfit klassifiziert (Abb. 32, 35).
  - a) Hochreaktive Oligonukleotide wurden den einzelsträngigen Schleifen zugeordnet.
  - b) Schwer modifizierbare Oligonukleotide ließen sich zu kurzen doppelhelikalen Abschnitten anordnen (Tab. 4).
  - c) Auf Grund ähnlicher Reaktivität gegen Bisulfit konnten die Kombinationsmöglichkeiten überlappender Fragmente eingeschränkt werden (Tab. 2, 3).
4. Ein von D. Riesner auf Grund physikalisch-chemischer Untersuchungen vorgeschlagenes Strukturmodell für Viroide (19) wurde verbessert und den Primärstrukturanalysen (H. Domdey, C. Lossow) und den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Sekundärstrukturuntersuchung angepaßt (Abb. 38 b).
5. Allgemeine Beziehungen zwischen der Bruttozusammensetzung von Oligonukleotiden und der Lage auf dem Fingerprint wurden für das verwendete Trennsystem abgeleitet (Abb. 39, 40).

G. Literaturverzeichnis

1. Kornberg, A. (1974) "DNA Synthesis". Herausgeber: Freeman, W.H. und Company, San Francisco
2. "mRNA: The Relation of Structure to Function" (1976) Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol, 19
3. "The Mechanism of Protein Synthesis" (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34
4. Zachau, H.G. (1969) Angew. Chem. 81, 645-662
5. Wittmann, H.G. (1976) Eur. J. Biochem. 61, 1-13
6. Diener, T.O. (1974) Ann. Rev. Microbiol. 28, 23-39
7. Sanger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J. und Kleinschmidt, A.K. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3852 - 3856
8. Kim, S.H., Quigley, G.J., Suddath, F.L., McPherson, A., Sneden, D., Kim, J.J., Weinzierl, J., Rich, A. (1973) Science 179, 285 - 288
9. Jack, A., Ladner, J.E. und Klug, A. (1976) J. Mol. Biol. 108, 619 - 649
10. Sussmann, J.L., Kim, S.H. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 89 - 96
11. Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R., Zamir, A. (1965) Science 147, 1462 - 1465
12. Zachau, H.G., Dutting, D. und Feldmann, H. (1966) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 347, 212 - 235
13. Barrell, B.G., Clark, B.F.C. (1974) "Handbook of Nucleic Acid Sequences", Joynson-Bruvers Ltd., Oxford
14. Dirheimer, G., Keith, G., Martin, R., Weissenbach, J. (1976) in "Synthesis, Structure and Chemistry of Transfer Ribonucleic Acids and Their Components", Proceedings

of the International Conference, Poznan (Polen), 273 - 290

15. Sigler, P.B. (1975) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 4, 477 - 527
16. Rich, A., RajBhandary, U.L. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* 45, 805 - 860
17. Nishimura, S. (1972) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 12, 49 - 85
18. Semancik, J.S., Morris, T.I., Weathers, L.G., Rodorf, B.F. und Kearns, D.R. (1975) *Virology* 63, 160 - 167
19. Henco, K., Riesner, D. und Sanger, H.L. (1977) *Nucleic Acids Res.* 4, 339 - 342
20. Crick, F. (1966) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 3 - 9
21. Khorana, H.G. (1968) "Polynucleotide Synthesis and the Genetic Code", *The Harvey Lectures, Series 62*, 79 - 105, Academic Press., New York und London
22. Söll, D., (1971) *Science* 173, 293 - 299
23. Gross, H.J. (1973) *J.molec. Evol.* 2, 339 - 342
24. Hall, R.H. (1971) "The Modified Nucleosides in Nucleic Acids", Columbia University Press, New York und London
25. Fleissner, E. und Borek, E. (1962) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48, 1199 - 1203
26. Kuchino, Y. und Nishimura, S. (1974) *Biochemistry* 13, 3683 - 3688
27. Schäfer, K.P. und Söll, D. (1974) *Biochimie* 56, 795 - 804
28. Kuchino, Y. und Nishimura, S. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 306 - 313
29. Wildenauer, D., Gross, H.J. und Riesner, D. (1974) *Nucleic Acids Res.* 1, 1165 - 1182

30. Gambaryan, A.S., Venkstern, T.V. und Bayev, A.A. (1976) Nucleic Acids Res. 8. 2079 - 2087
31. Aschhoff, H.J., Elten, H., Arnold, H.H., Mahal, G., Kersten, W. und Kersten H. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 3109 - 3122
32. Kerr, S.J. und Borek, E. (1972) "Advances in Enzymology" 36, 1 - 27, Interscience Publishers, New York
33. Kerr, S.J. und Borek, E. (1973) in "The Enzymes", Vol 9, 167 - 195, Boyer, P.D., Academic Press, New York
34. Cantoni, G.L. (1965) in "Transmethylation and Methionine Biosynthesis", 21 - 32, Shapiro, S.K. und Schlenk, F., University of Chicago Press, Chicago
35. Romeo, J.M., Delk, A.S. und Rabinowitz, J.C. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 61, 1256 - 1261
36. Delk, A.S. und Rabinowitz, J.C. (1974) Nature 252, 106 - 109
37. Arnold, H.H., Schmidt, W. und Kersten, H. (1975) FEBS Letters 52, 62 - 65
38. Arnold, H.H. und Kersten, H. (1975) FEBS Letters 53, 258 - 261
39. Delk, A.S. und Rabinowitz, J.C. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 528 - 530
40. Schmidt, W., Arnold, H.H. und Kersten, H. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 303
41. Arnold, H.H., Schmidt, W., Raettig, R., Sandig, L., Domdey, H. und Kersten, H. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 176, 12 - 20
42. Delk, A.S., Romeo, J.M., Nagle, D.P. und Rabinowitz, J.C. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7649 - 7656
43. Piper, P.W. und Clark, B.F.C. (1974) FEBS Lett. 47, 56 - 59

44. Piper, P.W. (1976) *Eur. J. Biochem.* 51, 295 - 304
45. van Calcker, D. und Hilse, K. (1974) *FEBS Lett.* 39, 56 - 60
46. Takemoto, T., Takeishi, K., Nishimura, S. und Ukita, T. (1973) *Eur. J. Biochem.* 38, 489 - 496
47. Crick, F. (1966) *J. Mol. Biol.* 19, 548 - 555
48. Piper, P.W. und Clark, B.F.C. (1974) *Nature* 247, 516 - 518
49. Simsek, M., RajBhandary, U.L., Boisnard, M. und Petrisant, G. (1974) *Nature* 247, 518 - 520
50. Keith, G., Ebel, J.P. und Dirheimer, G. (1974) *FEBS Lett.* 48, 50 - 52
51. Roe, B.A., Anandaraj, M.P.J.S., Chia, L.S.Y., Randerath, E., Gupta, R.C. und Randerath, K. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1097 - 1105
52. Sawyer, R.C., Harada, F. und Dahlberg, J.E. (1974) *J. Virol.* 13, 1302 - 1311
53. Gross, H.J., Simsek, M., Raba, M., Limburg, K., Heckman, J., RajBhandary, U.L. (1974) *Nucleic Acids Res.* 1, 35 - 43
54. Raba, M. (1976) *Dissertation, Universität München*
55. Shapiro, R., Servis, R.E., Welcher, M. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 422 - 424
56. Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 724 - 726
57. Kućan, Z., Freude, K.A., Kućan, I., Chambers, R.W. (1971) *Nature New Biol.* 232, 177 - 179
58. Goddard, J.P. und Schulmann, L.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3864 - 3867
59. Chambers, R.W., Aoyagi, S., Furukawa, Y., Zawadzka, H. und Bhanot, O.S. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5549 - 5551

60. Hayatsu, H. (1976) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 16, 75 - 124
61. Goddard, J.P. und Maden, B.E.H. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 431 - 440
62. Wintermeyer, W. und Zachau, H.G. (1970) FEBS Lett. 11, 160 - 164
63. Simsek, M., Petrissant, G. und RajBhandary, U.L. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2600 - 2604
64. Philippsen, P. und Zachau, H.G. (1972) Biochim. Biophys. Acta 277, 523 - 538
65. Sanger, F., Brownlee, G.G. und Barrel, B.G. (1965) J. Mol. Biol. 13, 373 - 398
66. Szekely, M. und Sanger, F. (1969) J. Mol. Biol. 43, 607 - 617
67. Brownlee, G.G. (1972) "Determination of Sequences in RNA". Herausgeber: Work, T.S. und Work, E., North-Holland Publishing Company, Amsterdam
68. Simsek, M., Ziegenmeyer, J., Heckmann, J. und RajBhandary, U.L. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1041 - 1045
69. Madison, J.T. (1967) in "Methods in Enzymology", Herausgeber: Grossmann, L. und Moldave, K., Academic Press inc., New York, XI A, 137 - 139
70. Blatt, R.D., Martin, J.K., Ploesner, J. Mc. T. und Murray, J. (1954) J. Am. Chem. Soc. 76, 3663 - 3665
71. Limburg, K. (1976) Dissertation, Universität München
72. Nishimura, S., Jones, D.S., Ohtsuka, E., Hayatsu, H., Jacob, T.M. und Khorana, H.G. (1965) J. Mol. Biol. 13, 283 - 301
73. Topal, M.D. und Fresco, J.R. (1976) Nature 263, 289 - 293
74. Mitra, S.K., Lustig, F., Åkesson, B., Lagerquist, U. und Strid, L. (1977) J. Biol. Chem. 252, 471 - 478

75. Peacock, A.C. und Dingmann, C.W. (1968) *Biochemistry* 7, 668 - 674
76. Loening, U.E. (1969) *Biochem. J.* 113, 131 - 138
77. Marcu, K., Mignery, R., Reszelbach, R., Roe, B., Sirover, M. und Dudock, B. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 477 - 483
78. Leboy, P.S. (1970) *Biochemistry* 9, 1577 - 1584
79. Pegg, A.E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 232, 630 - 642
80. Young, D.V. und Srinivasan, P.R. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 238, 447 - 463
81. Gross, H.J. und Czerny, E.-M. (1973) *FEBS Lett.* 30, 347 - 350
82. RajBhandary, U.L., Chang, S.H., Gross, H.J., Harada, F., Kimura, F. und Nishimura, S. (1969) *Federation Proc.* 28, 409
83. Wildenauer, D. (1974) Dissertation, Universität München
84. Pegg, A.E. (1972) *FEBS Lett.* 22, 339 - 342
85. Shershneva, L.P., Venkstern, T.V. und Bajev, A.A. (1973) *FEBS Lett.* 29, 132 - 134
86. Jank, P. und Gross, H.J. (1974) *Nucleic Acids Res.* 1, 1259 - 1268
87. Friedmann, S. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 1505 - 1510
88. Dimroth, O. (1909) *Justus Liebig's Ann. Chem.* 364, 183 - 226
89. Brown, D.J. (1961) *Nature* 189, 828 - 829
90. Macon, J.B. und Wolfenden, R. (1968) *Biochem.* 7, 3453 - 3458
91. Marcu, K. und Dudock, B. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62, 798 - 807

92. Tu, C.-P.D., Jay, E., Bahl, C.P. und Wu, R. (1976)  
Anal. Biochem. 74, 73 - 93
93. Volckaert, G., Min Jou, W. und Fiers, W. (1976) Anal.  
Biochem. 72, 433 - 446
94. Richardson, C.C., (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2,  
815 - 828
95. Panet, A., van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khorana,  
H.G., Rae, A.J., Lillehaug, J.R. und Kleppe, K. (1973)  
Biochem. 12, 5045 - 5050
96. Marutzky, R., Peterssen-Borstel, H., Flossdorf, J. und  
Kula, M.-R. (1974) Biotechnol. Bioeng. 16, 1449 - 1458
97. Kasang, G., Göldner, G., Weiss, N. (1971) J. Chromatogr.  
59, 393 - 400
98. Rogg, H., Wehrli, W. und Staehelin, M. (1969) Biochim.  
Biophys. Acta 195, 13 - 15
99. Gross, H.J. und Raab, C. (1972) Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 46, 2006 - 2011
100. Mans, R.J. und Novelli, G.D. (1960) Biochem. Biophys.  
Res. Commun. 3, 540 - 543
101. Tener, G.M. (1967) in "Methods in Enzymology", Heraus-  
geber: Colowick, S.P. und Kaplan, N.O., Academic Press  
Inc., New York, XII A, 398 - 404
102. Saneyoshi, M., unveröffentlicht
103. Brownlee, G.G., Sanger, F. und Barrel, B.G. (1968) J.  
Mol. Biol. 34, 379 - 412
104. Brownlee, G.G. und Sanger, F. (1969) Eur. J. Biochem.  
11, 395 - 399
105. Jay, E., Bambara, R., Padmanabhan, R. und Wu, R. (1974)  
Nucleic Acids Res. 1, 331 - 353
106. Gillum, A.M., Urquhart, N., Smith, M. und RajBhandary,  
U.L. (1975) Cell 6, 395 - 405
107. Glynn, I.M. und Chappell, J.B. (1964) Biochem. J. 90,  
147 - 149

## H. Lebenslauf

- Zur Person: Am 25.12.1946 wurde ich als Sohn von Dipl.-Ing. Werner Jank und seiner Ehefrau Lydia Jank (geb. Hildebrandt) in Kaufbeuren geboren.
- Schulbildung: 1953 - 1954: Besuch der Volksschule in Neukirch, Kreis Tettnang.  
1954 - 1957: Fortsetzung der Volksschulzeit in der Hohewartschule in Stuttgart-Feuerbach.  
1957 - 1959: Schüler des Gymnasiums für Jungen in Stuttgart-Feuerbach.  
1959 - 1966: Besuch des Klenze-Gymnasiums in München mit abschließender Reifeprüfung.
- Wehrdienst: 1966 - 1968: Nach zweijähriger Dienstzeit wurde ich als Unteroffizier entlassen.
- Studium: Im Wintersemester 1968 begann ich mit dem Chemiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München.  
Im Sommersemester 1973 legte ich die mündliche Diplomchemikerhauptprüfung ab.  
Seit November 1973 arbeite ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München. Hier fertigte ich sowohl die Diplom- (1973 - 1974) als auch die Doktorarbeit (1974 - 1977) an.







